



Estágio na fábrica de conservas La Gondola:

Influência da temperatura e do tempo de processamento na qualidade e segurança final de lombos de atum

Soraia Filipa Ribeiro Leite

Mestrado em Tecnologia e Ciência Alimentar

2017

Orientador

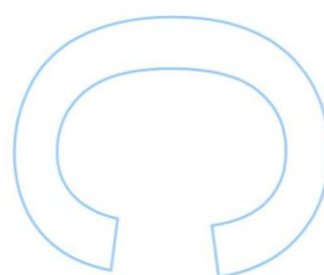
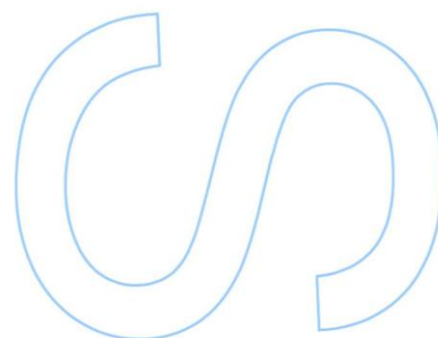
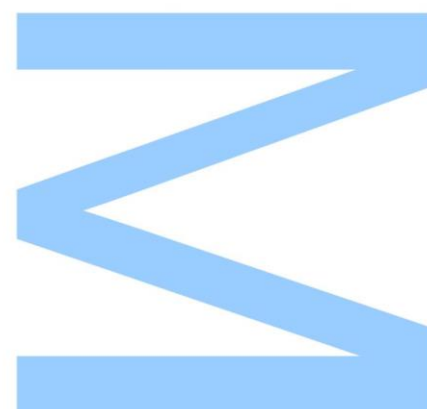
Professor Doutor Paulo Vaz-Pires,

Professor associado no Instituto de Ciências
Biomédicas Abel Salazar

Coorientador

Engenheira Elisabete Macedo,

Responsável pelo Departamento do Controlo
de Qualidade da Fábrica de Conservas La
Gondola

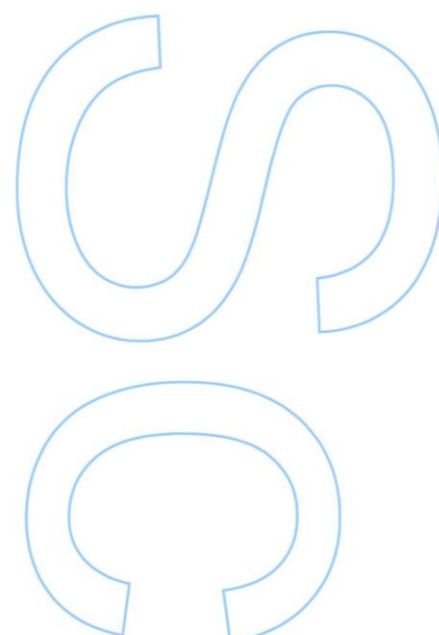
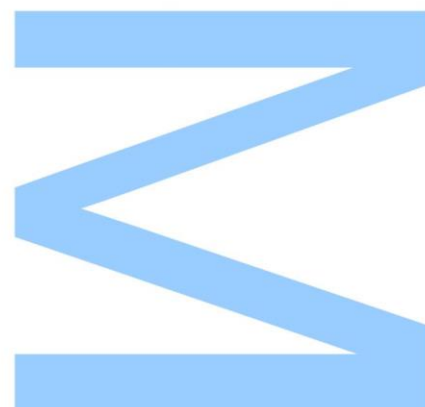




Universidade do Minho

Todas as correções determinadas
pelo júri, e só essas, foram efetuadas.
O Presidente do Júri,

Porto, ____/____/____



Agradecimentos

Agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, em especial ao Professor Doutor Paulo Vaz-Pires, que desde o primeiro contacto se disponibilizou de imediato a ajudar a encontrar um local onde eu pudesse realizar o estágio e a ser meu orientador, e por todo o apoio, disponibilidade e orientação durante todo o processo.

Agradeço também à Fábrica de conservas La Gondola, o acolhimento do meu projeto em particular à Eng^a. Elisabete Macedo, que me integrou de imediato, aconselhou, orientou, por toda a liberdade para explorar a empresa e pela confiança depositada em mim.

Por fim, agradeço a toda a minha família e namorado por todo o apoio incondicional e paciência durante todo o trabalho.

Abstract

This report provides theoretical support and a summary of the activities carried out during the internship at La Gondola. This internship lasted 8 months, with the main objectives being familiarization with the industrial environment of a canning factory and processing of tuna as well as the entire production process and inclusion in a work environment in a quality control laboratory of a canning and processing company.

There is a growing concern for humans to feed themselves in a healthy way and with safe foods that are free of substances capable of causing some kind of disease or malaise. This concern is also taken by industries that are constantly evolving to be able to provide food with high quality and safety. To this end, there are strict measures and plans that aim to guarantee the safety and quality of the final product, not only by evaluating it at the end of production, but also by constant control during all stages of processing. An example of a plan that most industries adopt is the Hazard Analysis and Critical Control Points (HACCP) system.

There are also several national, European and worldwide organizations whose main objective is to regulate and control various parameters (biological, chemical, physical and organoleptic) that ensure that food is safe for the consumer.

Routine analyses have been introduced in the industries, with relatively rapid results, so that they can control the quality of their products more rigorously. An example of routine chemical analysis is the histamine analysis, which can be used as an indicator of the quality of certain foods, such as fish, meat and cheese.

Histamine is a biogenic amine, being synthesized through the amino acid histidine, under the action of L-histidine decarboxylase, being a mediator of anaphylactic reactions.

It should be noted that histamine is very heat stable, which means that the normal confection of fish or other food, and even its sterilization in the case of preserved fish, is not sufficient for its elimination. Histamine poisoning is a worldwide problem that occurs most often in countries where a large amount of fish is consumed. Although it is a benign disease, it can cause symptoms such as facial flushing, urticaria, edema, the gastrointestinal tract may also be affected as well as the nervous system.

Keywords:

Tuna, canned, amines, histidine, histamine, ELISA, HACCP, QIM, food poisoning, food safety.

Resumo

O presente relatório serve de apoio teórico e resumo das atividades desenvolvidas durante o estágio realizado na empresa de conservas La Gondola. Este estágio teve duração de 8 meses, tendo como principais objetivos a familiarização com o ambiente industrial de uma fábrica de conservas e de transformação de atum bem de como todo o processo produtivo e inserção em contexto de trabalho num laboratório de controlo de qualidade de uma empresa de conservas e de transformação de atum.

Cada vez existe uma maior preocupação por parte da população em geral em se alimentar de forma saudável, com alimentos seguros e que sejam isentos de substâncias capazes de provocar algum tipo de doença ou mal-estar. Esta preocupação é também tomada por parte das indústrias alimentares, que se encontram em constante evolução para conseguirem disponibilizar alimentos com elevada qualidade e segurança. Para tal, existem medidas e planos rigorosos, que têm como finalidade garantir a segurança e qualidade do produto final, não só pela avaliação deste no final da produção, mas também pelo controlo constante durante todas as etapas de processamento. Um exemplo de plano que grande parte das indústrias alimentares adota é o sistema de HACCP (Hazard Analysis and Critical Control Points).

Existem ainda várias organizações nacionais, europeias e mundiais que têm como principal objetivo regulamentar e controlar vários parâmetros (biológicos, químicos, físicos e organoléticos) que garantam que o alimento é seguro para o consumidor.

Nas indústrias foram introduzidas análises de rotina, com possibilidade de obtenção de resultados rápidos e claros, para que estas possam fazer um controlo mais rigoroso da qualidade dos seus produtos. Análises químicas de rotina são, por exemplo, as análises de deteção e quantificação de histamina, que se podem usar como indicador da qualidade de certos alimentos, como pescado, carne e queijo.

A histamina é uma amina biogénica, sendo sintetizada através do aminoácido histidina, sob ação da L-histidina descarboxilase, sendo um mediador de reações anafiláticas.

Importa referir que a histamina é bastante estável ao calor, o que faz com que a confeção normal dos peixes ou outros alimentos, e mesmo a sua esterilização no caso das conservas de peixe, não seja eficaz na sua eliminação. O envenenamento

por histamina é um problema a nível mundial e ocorre mais frequentemente em países onde se consome muito pescado. Apesar de se tratar de uma doença de carácter benigno, pode provocar sintomas como, ruborização facial, urticária, edema, o trato gastrointestinal pode ser também afetado, bem como o sistema nervoso.

Palavras-chave: Atum, conservas, aminas, histidina, histamina, ELISA, HACCP, QIM, intoxicações alimentares, segurança alimentar.

Índice

Agradecimentos	2
Abstract	3
Resumo	4
Índice de figuras	8
Índice de tabelas	9
Lista de abreviaturas	10
1. Introdução	12
2. Principais constituintes do pescado	15
3. Alterações <i>post-mortem</i> no pescado	17
4. Aminas biogénicas	18
4.1. Microrganismos produtores	20
4.2. Fatores que influenciam a produção de aminas	22
4.3. Metabolismo/toxicologia das aminas biogénicas	23
4.4. Histamina	24
4.5. Mecanismo de ação	26
4.6. Apresentação clínica	27
4.7. Limites legais	28
4.8. Histamina nos peixes	29
5. Avaliação da qualidade e segurança do pescado	30
5.1. Métodos sensoriais	31
5.2. Métodos químicos	32
5.3. Métodos de deteção das aminas	33
5.3.1. Cromatografia líquida de alta performance (HPLC)	34
5.3.2. Cromatografia em camada fina	34
5.3.3. Cromatografia gasosa	35
5.3.4. Método fluorométrico	35
5.3.5. <i>Kits</i> enzimáticos	35
5.3.6. Deteção de microrganismos produtores de aminas biogénicas	36
6. Sistema de segurança alimentar - HACCP	37
7. Objetivo e enquadramento do estágio	40
8. A empresa	40
8.1. Fluxograma das atividades desenvolvidas diariamente na empresa	41
8.2. Espécies de atum	41
9. Fluxograma lombeira de atum	43
9.1. Receção da matéria-prima	44
9.2. Cozedura do atum	46
9.3. Recolha de amostras de atum cozido	46

9.4. Limpeza do atum	47
10. <i>Histamine ELISA</i> - imunoensaio enzimático para a determinação quantitativa da histamina nos alimentos	48
10.1. Amostragem e preparação das amostras.....	48
10.2. Procedimento para a derivatização	49
10.3. Procedimento para o método de ELISA	49
10.4. Quantificação da histamina	49
11. Determinação do teor de cloreto de sódio.....	51
11.1. Amostragem e preparação das amostras.....	51
11.2. Titulação	51
12. Discussão	53
13. Conclusão.....	55
14. Bibliografia.....	56
Anexo I - Resultados de Histamina obtidos durante os meses de março e abril	61

Índice de figuras

Figura 2 - Fluxograma das atividades desenvolvidas diariamente na empresa	41
Figura 3 - Fluxograma Lombeira	43
Figura 4 - Exemplo de resultados obtidos após a inserção dos valores de absorvância obtidos no software RIDASOFT®.....	50
Figura 5 - Exemplo de curva de calibração.....	50
Figura 6 - Exemplo de soluções antes e depois da viragem de cor que indica o fim da titulação.....	52

Índice de tabelas

Tabela 1 - Principais constituintes pescado	15
Tabela 2 - Principais aminas biogénicas e seus aminoácidos precursores	20
Tabela 3 - Parâmetros e critérios para cotação de frescura de peixes azuis	32
Tabela 4 - Características avaliadas à chegadas da matéria-prima	45

Lista de abreviaturas

ASAE – Autoridade de Segurança Alimentar e Económica

ATP – Adenosina 5'-trifosfato

DAO – Diamino-oxidase

DMA – Dimetilamina

DNA – Ácido desoxirribonucleico

EFSA – Agência Europeia de segurança alimentar

ELISA – Enzyme-linked immunosorbent assay

UE – União Europeia

EUA – United States of America (Estados Unidos da América)

FA – Formaldeído

FAO – Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura

FDA – Food and Drug Administration (Agência federal do Departamento de Saúde e Serviços Humanos dos Estados Unidos)

HACCP – Hazard Analysis and Critical Control Point ou Análise de Perigos e Controlo de Pontos Críticos

HDC – Histidina descarboxilase

HNMT – Histamina N-metiltransferase

HPLC – Cromatografia líquida de alta performance

ICMSF – Comissão Internacional de Especificações Microbiológicas dos Alimentos

IGE – Imunoglobulina E

MAO – Monoamino-oxidase

NASA – National Aeronautics and Space Administration (Administração Nacional da Aeronáutica e do Espaço dos Estados Unidos da América)

NPN – Azoto não-proteico

OMS – Organização Mundial da saúde

PAO – Poliamina-oxidase

PCC – Pontos críticos de controlo

PCR – Reação em cadeia da polimerase

PSE – Éster de N-hidroxissuccinimida do ácido 4- (1-Pirene) butírico

QIM – Método do índice de qualidade

SSO – *Specific spoilage organisms*

TMA – Trimetilamina

TMAO – Óxido de trimetilamina

1. Introdução

Desde a antiguidade que a pesca do atum faz parte da cultura humana, não só como fonte de alimento, mas também como modo de vida, empregando centenas de pessoas. Inicialmente a pesca era realizada pelos habitantes de pequenas povoações costeiras, com recurso a pequenos instrumentos bastante rudimentares. Devido às suas características migratórias, a pesca do atum era uma atividade essencialmente sazonal, dependente do ciclo de vida do peixe (Costa, 2013).

A vasta distribuição desta espécie pelos três oceanos, especialmente por águas temperadas e tropicais, deu suporte a uma atividade de pesca massiva que continua nos dias de hoje (Costa, 2013).

A grande variedade de espécies de tunídeos e a qualidade da parte edível determinam o respetivo valor comercial. A pesca do atum, além de gerar um enorme fluxo comercial, com os correspondentes interesses económicos associados, criou também uma importante indústria de transformação de tunídeos em conserva (a principal indústria de transformação de pescado a nível mundial). Devido à grande demanda de matéria-prima para esta indústria transformadora, houve a necessidade de criar uma frota específica, diretamente associada ao sector nos diferentes oceanos para a captura e posterior transformação e comercialização (Suanzes-Carpegna, 2003).

As espécies de atum que se destinam à indústria de conservas são, fundamentalmente, tropicais e são capturadas nos oceanos Índico, Pacífico e Atlântico Centro-Este. Entre as espécies mais capturadas encontram-se o albacora (*Thunnus albacares*), também denominado atum de barbatanas amarelas, o gaiado ou *skipjack* (*Katsuwonus pelamis*), o patudo ou *bigeye* (*Thunnus obesus*), e, em muito menor escala, o voador ou bonito-do-Norte (*Thunnus alalunga*), de “carne” muito apreciada, mas mais localizado no noroeste do Atlântico, encontrando-se circunscrito às frotas de Espanha, França e Portugal, com características essencialmente artesanais (Suanzes-Carpegna, 2003).

Como referido anteriormente, o atum constitui o principal produto da indústria conserveira tanto União Europeia (UE) como no resto do mundo, tendo sido registado um aumento constante do seu consumo nos últimos anos. A grande procura deste produto, o grande número de países que o capturam e transformam, a incidência que esta procura teve nas capturas, o crescente recurso à utilização de lombos de atum congelados (facilitando desta forma o transporte do produto "útil" para as conserveiras), a diversidade de espécies, qualidades e preços, a internacionalização e liberalização do mercado, conjugada com a subsistência de acordos comerciais

preferenciais contribuem, entre outros fatores, para criar uma complicada estrutura que torna o atual mercado do atum especialmente complexo (Suanzes-Carpegna, 2003).

No caso da UE, o atum representa quase 60 % da produção total de conservas de peixe, sendo Espanha, França e Portugal países designados como produtores e transformadores e Itália um grande país transformador (Suanzes-Carpegna, 2003).

A Tailândia, Equador, Espanha, China e Indonésia são os cinco principais exportadores de atum transformado e enlatado para o mercado global, sendo a Tailândia o maior exportador (mais de 250 000 t em 2016) (FAO, 2017). A Tailândia possui uma indústria de conservas dinâmica e converteu-se na principal potência importadora a nível mundial (407 000 t em 1993) a fim de abastecer a sua própria indústria, seguida pelo Japão (para peixe fresco e *sashimi*) e pelos EUA, para a sua indústria de conservas (Costa, 2013; Suanzes-Carpegna, 2003; FAO, 2017).

Na UE, Espanha e Itália são os principais importadores de matéria-prima (essencialmente filetes ou lombos). França constitui, por sua vez, o principal exportador de matéria-prima da UE, seguindo-se Espanha, ambos com destino à própria UE e aos EUA. No que toca à produção, a UE produz atualmente cerca de 350 000 t (dados de 2003) de conservas de atum por ano, tornando-se, assim, a principal zona produtora de conservas de atum a nível mundial (Costa, 2013; Suanzes-Carpegna, 2003).

Na UE consomem-se anualmente cerca de 550 000 t de conservas de atum, sendo a própria UE responsável pelo abastecimento de mais 65 % e o restante importado de países terceiros. A transformação da produção comunitária é basicamente feita em quatro países da comunidade. Espanha, com uma produção de 175 000 t de conservas de atum, representa mais de 54 % da produção comunitária, seguida de Itália, com uma produção que ronda as 120 000 t, representando 28 %. França produz cerca de 50 000 t, representando 14 %, e, por último, Portugal, com uma produção de 20 000 t, ou seja 6 % (Suanzes-Carpegna, 2003).

Tendo em conta todos estes dados, compreende-se a elevada importância que esta espécie de pescado tem na alimentação a nível mundial e que são necessárias medidas muito rigorosas, de forma a reduzir a possibilidade destes alimentos provocarem doenças de origem alimentar. Para isso, existe atualmente um vasto conjunto de normas e procedimentos nos quais estão incluídas as boas práticas de fabrico, sistemas de análise de perigos e pontos críticos e procedimentos padronizados, que as empresas do sector alimentar devem seguir de forma a garantir que todos os produtos que saem da empresa em questão possuem elevada qualidade e sejam seguros.

Apesar das conservas serem uma das formas mais comuns de manter os alimentos em segurança e preservar o seu valor nutricional, sem adição de conservantes, existem sempre riscos inerentes à possibilidade da matéria-prima possuir algum agente tóxico ou infeccioso ou da introdução de contaminantes durante o processamento. Para minimizar estes riscos para um nível seguro, existem então diversas medidas de segurança e de boas práticas de fabrico que todas as empresas do setor alimentar devem seguir.

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), uma doença de origem alimentar pode ser de natureza tóxica ou infecciosa, consequência da entrada de agentes patogénicos, através da ingestão de alimentos ou água (ASAE, 2015).

Estas doenças de origem alimentar podem ser divididas em dois grandes grupos, as infeções alimentares e as intoxicações alimentares. As infeções alimentares ocorrem após a ingestão de um determinado alimento contaminado com um microrganismo patogénico que tem capacidade de crescer no trato gastrointestinal. Nestes casos, os sintomas surgem após um período de incubação, que pode variar entre algumas horas, dias ou até mesmo semanas, visto ser necessário que o microrganismo se multiplique.

As intoxicações alimentares decorrem da ingestão de alimentos que contêm substâncias tóxicas, com origem no próprio alimento, de natureza microbiana ou química (ASAE, 2015).

A contaminação dos alimentos pode surgir por via direta ou indireta. Uma contaminação direta ocorre quando a substância tóxica está presente na matéria-prima. Por outro lado, a contaminação indireta pode ocorrer durante o processamento, manipulação ou preparação do alimento para posterior armazenamento (Bronzwaer, 2008).

2.Principais constituintes do pescado

A composição química do pescado varia muito de espécie para espécie havendo mesmo variações dentro da mesma espécie dependentes da idade, sexo, meio ambiente e estação do ano (Huss, 1995; Mauvault, 2009). Na tabela 1 podemos observar as percentagens, genéricas, da composição química do pescado.

Tabela 1-Principais constituintes pescado (percentagem) (valores retirados de Mauvault, 2009)

Constituinte	Quantidade (%)		
	Mínimo	Variação normal	Máximo
Proteínas	6	16 - 21	28
Lípidos	0,1	0,2 - 25	67
Hidratos de carbono		<0,5	
Cinzas	0,4	1,2 - 1,5	105
Água	28	66 - 81	96

Estas variações na composição química do pescado estão intimamente relacionadas com a sua alimentação, quantidade de alimento ingerido, movimentos migratórios e ciclos reprodutivos (mais especificamente com a altura da desova). Os peixes passam por períodos de fome, tanto provocados por razões naturais como fisiológicas (migração ou desova), ou mesmo por razões externas, como escassez de alimento. Durante estes períodos, em que as reservas energéticas são todas usadas, os peixes apresentam menores percentagens dos macronutrientes principais (proteínas e lípidos) nos seus músculos (Huss, 1995).

Durante os períodos de alimento abundante, em primeiro lugar regista-se um aumento do teor de proteína no tecido muscular, sendo que este aumento está dependente da quantidade de proteína que tenha sido esgotada durante a migração e desova. De seguida, aumenta o conteúdo lipídico. A fração lipídica é a que apresenta maiores variações. É também através do local de armazenamento dos lípidos que é possível fazer a distinção entre peixes magros e peixes gordos, os peixes magros são os que armazenam os lípidos apenas no fígado, por outro lado, os peixes gordos armazenam os lípidos em adipócitos distribuídos noutros tecidos corporais (Huss, 1995).

As espécies magras típicas são por exemplo, o bacalhau, o escamudo e a pescada. As espécies gordas incluem peixes pelágicos como o arenque, a cavala, o atum e o salmão.

O conteúdo lipídico dos filetes dos peixes magros é baixo e estável, enquanto o conteúdo lipídico dos filetes de espécies gordas varia consideravelmente. No entanto, a variação na percentagem de gordura reflete-se na percentagem de água, uma vez que a gordura e a água constituem normalmente cerca de 80 % do filete (Huss, 1995; Maulvault, 2009).

A quantidade de lípidos e a sua distribuição influencia também as alterações que ocorrem *post-mortem*. As mudanças que ocorrem no peixe fresco magro podem ser previstas com base no conhecimento de reações bioquímicas na fração proteica, enquanto em espécies gordas as mudanças nas frações lipídicas devem ser incluídas. Neste último caso uma das consequências é a diminuição do tempo de armazenamento devido à oxidação de lipídica (Huss, 1995).

O teor de hidratos de carbono no músculo dos peixes é muito baixo, normalmente abaixo de 0,5 %. Isto é típico para o músculo estriado, onde os hidratos de carbono ocorrem na forma de glicogénio e como parte dos constituintes químicos dos nucleótidos. Esta última é a fonte de ribose libertada como consequência das alterações autolíticas *post-mortem* (Huss, 1995).

Para além dos principais macronutrientes já referidos, que constituem cerca de 98 % do total da fração edível dos peixes, estes possuem ainda na sua composição sais minerais, compostos azotados e vitaminas, que constituem os restantes 2 % (Huss, 1995).

Os compostos azotados podem ser divididos em compostos solúveis em água, compostos de baixo peso molecular, e azoto (referido ao azoto de natureza não proteica). Esta fração NPN (azoto não proteico) constitui entre 9 a 18 % dos compostos nitrogenados totais nos teleósteos (Huss, 1995).

Os principais componentes desta fração são bases voláteis, tais como amoníaco e óxido de trimetilamina (TMAO), creatina, aminoácidos livres (arginina, lisina, histidina, prolina, etc.), nucleótidos e bases de purina (e, no caso de peixes cartilagíneos, ureia) (Huss, 1995).

A quantidade de vitaminas e minerais é típica de cada espécie e pode variar com a estação do ano. Em geral, o músculo do pescado é uma boa fonte de vitaminas B e, no caso das espécies gordas, também das vitaminas A e D (Huss, 1995; Maulvault, 2009).

Relativamente aos minerais, o músculo de peixe é considerado uma valiosa fonte de cálcio e fósforo, mas também de ferro, cobre e selénio. Os peixes de água salgada têm um alto teor de iodo (Huss, 1995; Maulvault, 2009).

3. Alterações *post-mortem* no pescado

O músculo do pescado possui quantidades apreciáveis de glicogénio, fosfocreatinina e adenosina 5'-trifosfato (ATP), a quantidade destas substâncias no momento da captura/morte é dependente do nível de esforço exercido pelo peixe durante a sua captura e abate (Aníbal, *et al.*, 2007; Nunes, *et al.*, 2007).

Logo após a captura/morte do pescado, começam a ocorrer alterações a nível autolítico, químico, microbiológico e sensorial (Aníbal, *et al.*, 2007).

Os processos de autólise, que são processos de autodestruição/morte celular, iniciam-se logo após a captura e abate. Na maioria destes processos estão envolvidas substâncias que derivam da metabolização do azoto, por exemplo, o óxido de trimetilamina (TMAO), que é um agente osmorregulador em peixes (Aníbal *et al.*, 2007; Nunes *et al.* 2007).

Este composto pode ser transformado em trimetilamina (TMA), através da ação bacteriana, sendo o TMA usado como um indicador químico de frescura do pescado (Norma NP 1841, 1991). O TMAO pode também ser convertido em dimetilamina (DMA) e formaldeído (FA), por influência enzimática. Outra amina biogénica produzida durante os processos de deterioração é a histamina. Esta amina biogénica, se presente, acima de uma certa concentração sistémica, pode torna-se tóxica provocando em algumas situações, vómitos, diarreias, dores abdominais, dores de cabeça e reações alérgicas cutâneas (Huss *et al.*, 2004).

As alterações químicas que ocorrem durante a deterioração são geralmente, ao nível da fração lipídica do pescado, quando esta entra em contacto com o oxigénio. Esta fração sofre então reações de oxidação e hidrólise, as quais resultam na produção de substâncias responsáveis pela rancidez e por sabores desagradáveis, os *off-flavors* (Huss *et al.*, 2004).

Grande parte das alterações da qualidade do pescado são consequência da actividade de microrganismos, ou specific spoilage organisms (SSO), nomeadamente *Shewanella putrefaciens*, *Vibronaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Photobacterium* sp., *Halococcus* sp. e *Halobacterium* sp. (Huss, 1995).

A deterioração do pescado é acelerada quando a carga microbiana é elevada (em termos de SSO) (Teixeira, 2012).

No que diz respeito às sensações percebidas através dos sentidos, as alterações sensoriais como, aparência, odor, textura, sabor, as alterações da qualidade do pescado são percebidas “a olho-nú” algum tempo após a captura. Destas alterações, a mais característica é o aparecimento do *rigor mortis*, que pode ser definido como um período transitório de rigidez muscular, que se segue à morte do

indivíduo. O início e a duração do período de *rigor mortis* varia consoante a espécie e as condições ambientais a que os peixes em causa estão expostos (Aníbal *et al.*, 2007).

Existem espécies em que esta alteração ocorre imediatamente a seguir à morte, enquanto noutras pode demorar mais de 20 horas a ocorrer. Em relação à duração do *rigor mortis*, pode durar poucas horas (1 a 2 horas) ou até mais de 100 horas, em algumas espécies. De qualquer forma, é geralmente aceite que quanto maior for a temperatura ambiente, mais rápidas serão as fases anteriormente descritas (Huss, 1995).

De um modo geral, o corpo dos peixes perde gradualmente o brilho e a pigmentação viva inicial tornando-se baço e descolorado. Os olhos tornam-se chatos e côncavos e a pupila negra viva no centro de uma córnea transparente passa a cinzenta rodeada por uma córnea opaca ou leitosa. As guelras, de cor vermelha, sem muco e com cheiro a algas marinhas logo após a captura, tornam-se acastanhadas, rodeadas por um muco opaco e espesso e desenvolvem um odor a ranço (Teixeira, 2012).

Outros aspetos da qualidade sensorial, como por exemplo o muco cutâneo, a consistência da carne ou o cheiro, são avaliados em função de critérios específicos de cada grupo de produtos de pescado, como já foi referido. As alterações descritas anteriormente têm lugar quase em simultaneamente, mas são mais importantes em determinados períodos: inicialmente o processo de autólise é dominante, enquanto a atividade bacteriana é mais importante no final (Aníbal *et al.*, 2007).

4. Aminas biogénicas

Do ponto de vista orgânico, as aminas biogénicas, são compostos básicos azotados, onde um, dois ou três átomos de hidrogénio do grupo amónia foram substituídos por grupos alquilo e arilo, e cuja formação resulta essencialmente da descarboxilação enzimática dos aminoácidos livres e da transaminação dos aldeídos e cetonas (Chong *et al.*, 2011). Estes compostos são bases orgânicas com baixo peso molecular que ocorrem naturalmente em microrganismos, plantas e animais como consequência do seu metabolismo (Rodriguez *et al.*, 2014; Merline *et al.*, 2015). Este grupo particular de aminas são designadas por aminas biogénicas devido à sua origem biológica e podem ser classificadas do ponto de vista estrutural como alifáticas (putrescina, cadaverina, espermina e espermidina), aromáticas (tiramina e

feniletilamina) e heterocíclicas (histamina e triptamina) (Gomes *et al.*, 2014; Rodriguez *et al.*, 2014; Eom *et al.*, 2015).

A biossíntese das aminas por descarboxilação dos aminoácidos livres pode ocorrer por duas vias bioquímicas: via endógena, através de descarboxilases naturalmente presentes nos alimentos, ou via exógena, através de descarboxilases libertadas por microrganismos associados aos alimentos. A produção endógena de aminas é insignificante quando comparada com a exógena (Novella-Rodríguez *et al.*, 2000; Rodriguez *et al.*, 2014; Lee *et al.*, 2015).

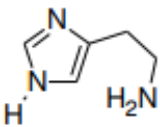
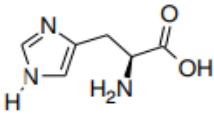
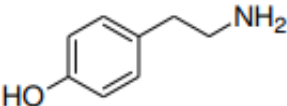
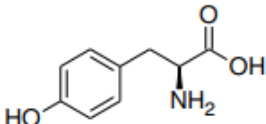
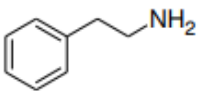
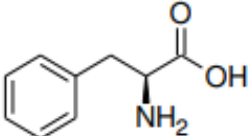
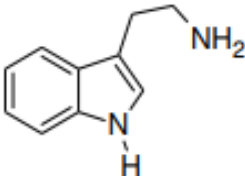
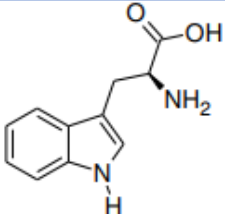
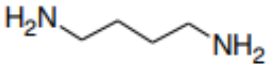
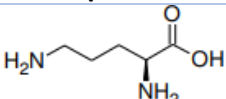

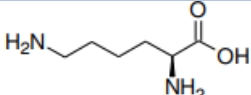
Estes microrganismos podem constituir a microbiota característica do alimento ou podem ser introduzidos antes, durante ou após o seu processamento. A concentração e formação de diferentes tipos de aminas estão diretamente relacionadas com a natureza dos alimentos e do tipo de microrganismo neles presentes. Em alimentos frescos, as aminas biogénicas estão, normalmente, presentes em baixas concentrações ou não são detetadas. No entanto, em alimentos de origem animal, como peixe, carne, ovos, queijos e alimentos fermentados, podem estar presentes em concentrações mais elevadas capazes de induzir intoxicações químicas, devido ao seu rápido aumento no processo *post-mortem* dos animais. No caso dos alimentos em questão se tratarem de pescado, o envenenamento por histamina, é o mais comum e significativo sendo designado por envenenamento escombróide, historicamente conhecido por sua associação com a ingestão de peixe na família *Scombridae*, que inclui atum e sardinha (Novella-Rodríguez *et al.*, 2000; Rodriguez *et al.*, 2014).

A acumulação de aminas biogénicas nos alimentos depende então da disponibilidade de aminoácidos livres e da presença de microrganismos com atividade de descarboxilase. Além destes fatores, a formação de aminas depende ainda de parâmetros intrínsecos e extrínsecos dos alimentos, tais como: temperatura, pH, disponibilidade de oxigénio, disponibilidade de fontes de carbono, presença de vitaminas e coenzimas e concentração de hidratos de carbono fermentáveis (Novella-Rodríguez *et al.*, 2000; Rodriguez *et al.*, 2014).

Os principais fatores que influenciadores da biossíntese desses compostos são as condições de armazenamento, boas práticas de fabrico, a quantidade de microrganismos com atividade de descarboxilase, a qualidade da matéria-prima e a disponibilidade de aminoácidos livres (Novella-Rodríguez *et al.*, 2000; Rodriguez *et al.*, 2014).

A tabela 2 descreve as principais aminas biogénicas envolvidas nestes processos, assim como os respetivos aminoácidos precursores.

Tabela 2 - Principais aminas biogénicas e seus aminoácidos precursores (imagens retiradas de Gomes *et al.*, 2013).

Aminas biogénicas	Aminoácidos precursores
 Histamina	 Histidina
 Tiramina	 Tirosina
 Feniletilamina	 Fenilalanina
 Triptamina	 Triptofano
 Putrescina	 Ornitina
 Cadaverina	 Lisina

4.1. Microrganismos produtores

Como já referido, a produção de aminas biogénicas requer a disponibilidade de aminoácidos livres e aminoácidos descarboxilases sintetizadas por bactérias (EFSA, 2011; Koohdar *et al.*, 2011; FAO, 2013). A histamina é formada, em algumas espécies de peixes, por microrganismos específicos, capazes de produzir a enzima histidina descarboxilase (HDC), que catalisa a conversão de histidina livre, naturalmente presente em níveis elevados no músculo desses peixes, a histamina. Tanto bactérias Gram-positivas como bactérias Gram-negativas podem produzir a histidina descarboxilase, sendo que as formas das enzimas diferem (EFSA, 2011;

FAO, 2013). Do mesmo modo, outras aminas biogénicas (putrescina, cadaverina e tiramina) são sintetizadas por descarboxilases produzidas por bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

De acordo com a literatura científica consultada, as seguintes espécies são as mais propensas a produzir histamina: *Morganella morganii*, *Morganella psychrotolerans*, *Photobacterium damsela*, *Photobacterium phosphoreum*, *Raoultella planticola* e *Hafnia alvei* (EFSA, 2011; Koohdar *et al.*, 2011; FAO, 2013; Lee *et al.*, 2015).

Para os tipos de aminas biogénicas que não a histamina, várias famílias ou géneros estão envolvidos na sua produção, como Enterobacteriaceae, Pseudomonaceae, *Lactobacillus*, *Enterococcus* e *Staphylococcus* (EFSA, 2011; FAO, 2013).

Nos peixes, as bactérias produtoras de aminas biogénicas são mais propensas a estar presentes nas brânquias, pele ou no trato gastrointestinal. A transferência destas bactérias para o músculo do peixe, onde os aminoácidos livres estão presentes, leva ao desenvolvimento de aminas biogénicas. Esta contaminação pode ocorrer através da migração das bactérias presentes no trato gastrointestinal após a captura, ou através de rutura e derramamento de conteúdo gástrico durante a evisceração. Os microrganismos também podem ser transferidos da pele ou das brânquias durante o processo de captura/luta (Koohdar *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2015). A quantidade de aminas biogénicas produzidas depende do nível de aminoácidos livres já presentes, o que está relacionado com as espécies de peixes e à quantidade e atividade das descarboxilases. A quantidade de descarboxilases está relacionada ao número de bactérias produtoras de descarboxilases transferidas para os peixes e na medida em que se multiplicam (EFSA, 2011; Koohdar *et al.*, 2011; FAO, 2013).

Yi-Chen Lee e a sua equipa de investigadores referem que, no caso do peixe-leite (*Chanos chanos*) sujeito a secagem, a bactéria presente em maior quantidade e com maior capacidade de produção de histamina era a *Raoultella ornithinolytica*, tendo sido responsável por um incidente de intoxicação alimentar, ocorrido em fevereiro de 2006, no sul de Taiwan.

No caso de alimentos obtidos por processos fermentativos, como os vinhos e os queijos, a presença de aminas biogénicas pode ter origem na própria matéria-prima, resultado da atividade dos próprios microrganismos envolvidos no processo ou, alternativamente, ter origem na atividade de microrganismos oportunistas capazes de se desenvolver nas condições que o processo de maturação ocorre (Fernandes, 2001).

Segundo Kordiovská *et al.* (2006), num estudo sobre a variação de aminas biogénicas e microrganismos produtores, ao longo do tempo e de variações de temperatura de conservação, verificaram a existência de uma relação direta entre a cadaverina e a putrescina com a quantidade de microrganismos presentes, o que as torna indicadores por excelência da qualidade do pescado.

De forma geral, a quantidade de bactérias presente no pescado armazenado depende da contaminação inicial da matéria-prima, assim como (e sobretudo) da temperatura e período de armazenamento (Kordiovská *et al.*, 2006).

4.2. Fatores que influenciam a produção de aminas

Muitas condições podem afetar o crescimento de microrganismos produtores de aminas biogénicas.

A temperatura é o principal determinante. As concentrações de amina biogénica dependem, portanto, da função combinada entre o tempo e a temperatura: tempos mais longos e temperaturas mais elevadas levará a um maior crescimento microbiano e a uma maior formação de aminas biogénicas (Koohdar *et al.*, 2011).

Outros fatores importantes podem ser envolvidos, incluindo pH, sal, disponibilidade de oxigénio e competição com outros microrganismos.

A disponibilidade de oxigénio parece ter um efeito significativo na biossíntese de aminas biogénicas. Em condições anaeróbicas, o *Enterobacter cloacae* reduz a quantidade de putrescina produzida em cerca de 50 % e a bactéria *Klebsiella pneumoniae* reduz significativamente a sua produção de cadaverina, por outro lado parece adquirir a habilidade de sintetizar putrescina. O potencial *redox* do meio também influencia a produção de aminas (Karovicova *et al.*, 2005).

Segundo Karovicova *et al.* (2005), um potencial *redox* baixo estimula a produção de histamina, visto que a histidina descarboxilase parece ser inativada ou destruída pela presença de oxigénio.

O pH influencia a produção de aminas biogénicas na medida em que, a atividade da descarboxilase é mais forte em ambiente ácido, sendo o pH ótimo entre 4,0 e 5,5. Além disso, nessas condições, as bactérias parecem produzir essas enzimas em maior quantidade como parte de seus mecanismos de defesa contra a acidez do meio (Karovicova *et al.*, 2005).

A presença de cloreto de sódio estimula a atividade da tirosina descarboxilase e inibe a atividade da histidina descarboxilase, ou seja, a síntese de tirosina é favorecida enquanto a produção de histamina é inibida. Para valores de cloreto de sódio a 3,5 %, a capacidade da *Lactobacillus buchneri* para formar histamina é

parcialmente inibida e com valores de 5,0 % a sua formação é interrompida (Karovicova *et al.*, 2005).

O fator predominante na produção de aminas biogénicas, após a captura/compra do pescado, é a duração e a temperatura do armazenamento. A formação de aminoácidos livres *post-mortem* e a sua rápida descarboxilação dependem da temperatura, sendo desta forma evidente que longos períodos de armazenamento a temperaturas altas induzem não só a produção de aminas biogénicas, como também a produção de amónia e outros compostos resultantes da degradação do pescado (FDA, 2011).

A enzima envolvida na produção de histamina, a histidina descarboxilase, requer temperaturas acima dos 15°C, com uma temperatura ótima de atuação de 30°C. Nos ambientes tropicais, onde o pescado é capturado em águas com temperatura que excedem em muito os 20°C, as condições tornam-se favoráveis à produção de aminas biogénicas pelas bactérias descarboxilase positivas, havendo assim uma necessidade evidente de, no mínimo, manter o pescado refrigerado após a sua captura. Embora o crescimento bacteriano seja inibido a temperaturas entre 0 e 5°C, a atividade enzimática não cessa, continuando assim a formação de aminas (Gingerich, 1998; Morii *et al.*, 2004).

A manutenção do pescado a temperaturas baixas durante todo o processo de armazenamento constitui a medida mais eficiente para o controlo da produção de aminas biogénicas. Todos os estudos realizados parecem concordar que o armazenamento a 0°C ou a temperaturas inferiores limita a níveis pouco significativos a formação de histamina (Huss, 1997; Morii *et al.*, 2004).

O aumento de aminas biogénicas com a congelação é mínimo na maioria dos casos. Ensaio experimentais demonstraram que quando o pescado é descongelado, o aumento de aminas biogénicas é menor que quando comparado com o pescado fresco mantido sob condições de temperatura idênticas, durante o mesmo período. Este facto poderá ser explicado pela redução da microflora durante o processo de congelação resultante dos danos ocorridos no seu *DNA* (Bai *et al.*, 2014).

4.3. Metabolismo/toxicologia das aminas biogénicas

As aminas biogénicas são necessárias em muitas funções fisiológicas, como, proliferação e diferenciação celular, regulação das funções do núcleo, síntese de proteínas, desenvolvimento cerebral, regulação e crescimento do sistema nervoso (Hattori *et al.*, 2017).

Na maioria das pessoas, as aminas consumidas em doses considerada “normais” através dos alimentos são metabolizadas muito rapidamente por enzimas específicas, as monoamino-oxidases (MAO), as diamino-oxidases (DAO) e a histamina N-metiltransferase (HNMT). No catabolismo da histamina, a DAO é a principal enzima responsável pela eliminação da histamina extracelular, estando aqui incluindo a ingestão de histamina derivada de alimentos, ou seja, é esta a enzima que é responsável pela proteção contra a histaminose ou intoxicação histamínica (Prester, 2011).

A ingestão de pescado já com algum grau de decomposição e, consequentemente, com níveis elevados de histamina pode diminuir a capacidade de desintoxicação da histamina por parte do organismo e causar sintomas clínicos de intoxicação por histamina, ou intoxicação escombrídea. Por outro lado, em indivíduos sensíveis, uma ingestão dietética menor de histamina pode causar sinais clínicos de intolerância alimentar (Karovicova *et al.*, 2005; Prester, 2011).

Nos seres humanos, a tiramina é catabolizada por enzimas MAO A e B. As poliaminas dietéticas, como a putrescina, a espermidina e a espermina são catabolizadas por várias enzimas, como por exemplo, a poliamina-oxidase (PAO), a DAO, a espermidina /espermina acetiltransferase e outras oxidases presentes no intestino e no fígado (Karovicova *et al.*, 2005; Prester, 2011).

As aminas biogénicas, como tiramina, putrescina e cadaverina potenciam a toxicidade da histamina devido à competição com enzimas responsáveis pela metabolização da histamina (Prester, 2011).

Na maioria das vezes são produzidos elevados teores de histamina antes dos alimentos se apresentarem degradados ou com as propriedades organoléticas alteradas (Karovicova *et al.*, 2005).

4.4. Histamina

A histamina é considerada a amina mais tóxica dos alimentos, exercendo o seu efeito tóxico por intermédio de três tipos de recetores (H1, H2 e H3) presentes nas membranas celulares. O envenenamento por histamina é uma intoxicação alimentar química, resultante da ingestão de alimentos com níveis anormalmente elevados desta amina (Prester, 2011).

Como referido anteriormente, a histamina presente nesses alimentos ocorre a partir do aminoácido L-histidina, através de uma reação de descarboxilação

enzimática, levada a cabo por certas bactérias e catalisada pela histidina descarboxilase (Tahmouzin *et al.*, 2011; Mahusain *et al.*, 2016).

As bactérias que estão normalmente associadas à descarboxilação da histamina pertencem à família Enterobacteriaceae, sendo as mais comuns, *Morganella morganii*, *Klebsiella pneumonia* e *Hafnia* (EFSA, 2011).

A *M. morganii* é a principal bactéria produtora de histamina, esta desenvolve-se melhor a pH neutro, mas o seu desenvolvimento pode também ocorrer na gama de pH de 4,7 - 8,1 (Frank *et al.*, 1987).

É importante salientar, que se houver produção de histamina no peixe, o risco de provocar doença é muito elevado. Esta amina biogénica é resistente ao calor pelo que, mesmo que o peixe seja cozinhado, enlatado ou tratado a quente de qualquer outra maneira, antes de ser consumido, a histamina não é destruída (Alfama, 2009; Tahmouzin *et al.*, 2011).

Algumas espécies de peixes como os escombrídeos, grupo ao qual pertence o atum, são mais comumente envolvidos nas intoxicações por histamina porque possuem elevadas quantidades de histidina livre nos seus tecidos musculares, que serve como substrato para a histidina descarboxilase, processo que ocorre durante a decomposição do pescado (Mahusain *et al.*, 2016).

O consumo de pescado pertencente a esta família e de outros peixes marinhos não escombrídeos também pode resultar no envenenamento por histamina (Mahusain *et al.*, 2016).

Tal como já foi descrito, os elevados níveis de histamina nestes peixes normalmente são resultado de abusos de tempo/temperatura e de um incorreto manuseamento por parte dos operadores. Para evitar que os valores de histamina atinjam estes níveis, o peixe deve ser rapidamente refrigerado a uma temperatura o mais próxima possível de 0°C após a captura ou então congelado, devem também ser seguidas as boas práticas de fabricação e boas práticas de higiene durante o todo o processamento (Tahmouzin *et al.*, 2011; Mahusain *et al.*, 2016).

O envenenamento por histamina é um problema a nível mundial e ocorre mais frequentemente em países onde se consome muito peixe de espécies passíveis de conter elevados níveis de histamina. Esta é uma doença de carácter benigno, tendo um período de incubação bastante curto (desde alguns minutos até algumas horas) e a duração da doença é normalmente curta (algumas horas). Os sintomas mais comuns são cutâneos tais como ruborização facial, urticária, edema, sendo que o trato gastrointestinal pode ser também afetado, bem como a nível neurológico (Huss, 1997).

No que se refere à segurança alimentar, o nível máximo de histamina permitido em Portugal, segundo diretrizes da EU, é de 20 mg/100 g de amostra de pescado e o

método analítico de referência é a HPLC (Cromatografia líquida de alta performance) (Huss, 1997; EFSA, 2011).

4.5. Mecanismo de ação

A histamina endógena encontra-se armazenada em mastócitos e basófilos, sendo que os seus efeitos somente são observados, quando esta substância é libertada em grande quantidade em resposta a uma reação alérgica. Neste caso, a resposta é mediada por anticorpos (IgE), previamente ligados à superfície membranar dos mastócitos e capazes de, na presença do respetivo antigénio, desencadear uma série de eventos bioquímicos em cascata que levam à libertação da histamina e de uma série de outros componentes armazenados conjuntamente. No caso da origem exógena de histamina, em grandes quantidades, esta exerce os seus efeitos ligando-se aos recetores específicos presentes nas membranas celulares dos sistemas respiratório, cardiovascular, gastrointestinal e hematológico/imunológico e na pele (Karovicova *et al.*, 2005; FAO, Criado *et al.*, 2010).

Estes recetores podem ser de três tipos, H1, H2 e H3. Os sintomas mais comuns verificam-se a nível do sistema cardiovascular, entre os quais, dilatação de vasos sanguíneos periféricos, capilares e artérias, resultando em hipotensão, rubor e dor de cabeça. A nível do sistema gastrointestinal, normalmente verifica-se a contração induzida por histamina da musculatura intestinal lisa, mediada por recetores H1, o que pode explicar as cólicas abdominais, diarreia e vômitos. A secreção de ácido gástrico é regulada pela histamina através dos recetores H2 localizados nas células parietais. A dor e o prurido associados às lesões urticárias podem ser devidas à estimulação sensorial e neuronal motora através dos recetores H1. Sobre os recetores H3, pensa-se serem responsáveis pela regulação da síntese e libertação de histamina a nível do sistema nervoso central (Karovicova *et al.*, 2005; Criado *et al.*, 2010; FAO, 2013).

Os seres humanos metabolizam a histidina em ácido urocânico através da atividade da L-histidina amónia-liase, podendo formar glutamato e posteriormente o α -cetoglutarato, que entra no ciclo do ácido cítrico, ou pode dar origem a histamina através da atividade da histidina descarboxilase (Criado *et al.*, 2010; FAO, 2013).

Formada a histamina, ou ingerida através da alimentação, existem duas formas de metabolismo desta amina no corpo humano. No ciclo do azoto o imidazol é metilado pela histamina N-metiltransferase dando origem ao composto N-metil-histamina, que é posteriormente, oxidado pela monoamino-oxidase em ácido N-

metilimidazol acético. Esta enzima é muito seletiva na desintoxicação de histamina e envolve a S-adenosilmetionina como dador do grupo metilo. A histamina é então oxidada pela diamino-oxidase em ácido imidazoleacético, que se liga à ribose. A N-metilação é o principal mecanismo responsável pelo término das ações neurotransmissoras da histamina no cérebro, sendo também a principal via para o metabolismo da histamina no epitélio brônquico (Karovicova *et al.*, 2005; Criado *et al.*, 2010).

A histamina também é convertida em acetil-histamina inativa no intestino, presumivelmente, por enzimas bacterianas (Karovicova *et al.*, 2005; Criado *et al.*, 2010).

O rim humano apresenta uma capacidade considerável para remover a histamina do sangue. Quando a indivíduos saudáveis foi administrada, por via intravenosa, uma certa quantidade de histamina, grande parte foi metilada pelo rim e excretada na urina e uma menor proporção foi excretada inalterada na urina (Karovicova *et al.*, 2005; Criado *et al.*, 2010).

4.6. Apresentação clínica

Os humanos podem tolerar até cerca de 180 mg de histamina, administrada oralmente, sem que se verifiquem efeitos visíveis. No caso de administração intravenosa, apenas 0,007 mg de histamina é suficiente para aumentar a frequência cardíaca e provocar vasodilatação. Esta diferença observada sugere-nos que a histamina não é eficientemente absorvida a partir do trato gastrointestinal (FAO, 2012).

A gravidade dos sintomas varia de acordo com os níveis de histamina ingerido e também da sensibilidade do indivíduo a esta amina. Algumas das manifestações descritas incluem sensação de queimadura na língua, associadas a um sabor metálico e picante e irritação cutâneas (Hungerford, 2010). A contração do músculo liso do intestino provoca cólicas abdominais, diarreia e vômitos, sendo alguns dos sinais clínicos mais vulgares num caso de intoxicação por histamina (Karovicova *et al.*, 2005; FAO, 2012).

Em termos neurológicos, a histamina estimula através dos recetores H1, os neurónios motores e sensoriais, originando a sensação de dor e comichão presentes em casos de urticária, igualmente presente (Karovicova *et al.*, 2005; FAO, 2012).

A cadaverina e a putrescina, presentes em peixes deteriorados, podem funcionar como potenciadores da toxicidade da histamina, pois estas aminas biogénicas inibem importantes enzimas no processo de degradação da histamina (Rodriguez *et al.*, 2014).

A intoxicação escombroide nos peixes é um tipo de intoxicação alimentar com sintomas e formas de tratamento semelhantes às alergias associadas ao marisco (Prester, 2011).

4.7. Limites legais

Segundo a *Food and Drug Administration* (FDA) estabeleceu-se um valor limite de 500 mg/kg a partir do qual se considera que o peixe se encontra já com algum grau de deterioração (FDA, 2011).

Na União Europeia, através do Regulamento (CE) nº 1441/2007 de 5 de Dezembro de 2007, foi estabelecido que para produtos da pesca de espécies de peixes associadas a um elevado teor de histamina (em particular em espécies das famílias *Scombridae*, *Scomberesocidae*, *Clupeidae*, *Engraulidae*, *Coryfenidae* e *Pomatomidae*) o intervalo compreendido entre 100 mg e 200 mg para nove amostras (n), sendo que apenas duas amostras (c) podem apresentar valores dentro deste intervalo.

O método de referência estabelecido para a análise histamínica é a cromatografia líquida de alta performance (HPLC) (CE, 2007), utilizando o detetor UV ou de fluorescência. As análises devem ser efetuadas aos produtos quando estes são colocados no mercado durante o seu período de vida útil (EFSA, 2011).

No caso de produtos de pesca que tenham sido submetidos a um tratamento de maturação enzimática em salmoura, fabricados a partir de espécies de peixe associadas a um elevado teor de histidina (em especial em espécies das famílias *Scombridae*, *Scomberesocidae*, *Clupeidae*, *Engraulidae*, *Coryfenidae* e *Pomatomidae*), o mesmo regulamento estabeleceu o intervalo entre 200 mg e 400 mg para nove amostras (n), sendo que apenas duas amostras (c) podem apresentar valores dentro deste intervalo. O método de referência é igualmente a HPLC, utilizando o detetor UV ou de fluorescência (Huss, 1997). As análises devem ser efetuadas aos produtos quando estes são colocados no mercado durante o seu período de vida útil (CE, 2007).

De acordo com este mesmo regulamento, os resultados serão satisfatórios se o valor médio das amostras for inferior ao mínimo do intervalo do limite estabelecido, sendo que, nenhum dos valores observados pode exceder o valor máximo permitido.

Os resultados obtidos serão insatisfatórios se o valor médio exceder o limite mínimo ou mais do que c/n valores estiverem entre o intervalo de valores permitido ou se um ou mais valores estiverem acima do limite máximo (CE, 2007).

A Agência Europeia de Segurança Alimentar (EFSA) estabeleceu, em 2011, uma ingestão diária máxima de 50 mg de histamina e 600 mg de tiramina para adultos saudáveis. No entanto estes valores podem ser reduzidos em caso de intolerância. A histamina e a tiramina são consideradas as toxinas escombróides mais tóxicas e mais relevantes (EFSA, 2011).

4.8. Histamina nos peixes

Em suma, o pescado e os produtos da pesca estão frequentemente ligados às intoxicações por aminas biogénicas (Rodríguez *et al.*, 2014) e as espécies normalmente associadas a estes episódios pertencentes à família *Scomberesocidae* (agulhão) e *Scombridae* (tunídeos e sardas) (FAO, 2012).

Estes peixes caracterizam-se por serem naturalmente ricos em aminoácidos livres no músculo, principalmente em histidina, que pode ser catabolizada por duas vias metabólicas no músculo do peixe: desaminação para obter ácido urocânico ou descarboxilação para formar histamina (Karovicova *et al.*, 2005; Criado *et al.*, 2010). A primeira é a principal via em condições fisiológicas normais, porém em condições *post-mortem* e, no caso de haver contaminação bacteriana, a descarboxilação pode tornar-se a via mais significativa (Karovicova *et al.*, 2005; Criado *et al.*, 2010).

Segundo Bonnie Sun Pan *et al.* (1985), de 13 espécies de peixes migratórios observadas, todas de músculo escuro, em todas elas se registaram valores muito elevados de histidina livre nos músculos. Os peixes de músculo claro mostraram ter níveis muito baixos de histidina na parte edível (FAO, 1985).

Estes autores constataram ainda que os níveis de histamina variam de acordo com a parte do corpo do peixe. Durante 15 dias, foi levado a cabo um estudo envolvendo o gaiado (*Katsuwonus pelamis*) mantido em gelo; durante esse período foram medidos os valores de histamina em diferentes secções do peixe. No final, os investigadores concluíram que os valores de histamina mais elevados foram registados junto à cavidade abdominal, sendo que os mais baixos foram registados junto à barbatana caudal (FAO, 1985).

Ainda segundo os mesmos autores, foi verificado que os valores de histamina são muito mais elevados em cavalas inteiras do que em cavalas sem vísceras. Apesar do fígado apresentar um conteúdo mais baixo de histidina que os músculos durante o armazenamento este produz histamina muito mais rápido que os músculos, podendo aqui verificar-se uma relação entre o conteúdo de histamina e evisceração do peixe (FAO, 1985).

Dentro destas espécies, os valores de histidina livre variam também consoante a estação do ano. É durante o verão que se registam os valores mais elevados e no inverno os mais baixos (FAO, 1985).

Parece ser consensual na comunidade científica que nos surtos provocados por intoxicações associados a níveis elevados de histamina, esta é maioritariamente de origem bacteriana, desta forma pode ser usada como critério de avaliação da contaminação e deterioração dos produtos de pesca (Karovicova *et al.*, 2005; Hungerford, 2010). No entanto, outras aminas biogénicas podem igualmente ser utilizadas como indicadores do grau de frescura e qualidade do pescado, visto que os seus teores se alteram durante o processo de deterioração (Prester, 2011).

A produção de cadaverina e putrescina durante o processo de deterioração do pescado deve-se, presumivelmente, a enzimas bacterianas não envolvidas no processo de descarboxilação da histidina.

Uma vez que a determinação da histamina por si só nem sempre pode traduzir de forma exata o estado de frescura do pescado, não funcionando nestes casos como indicador da qualidade, foi estabelecido um índice químico de qualidade para estimar o nível de degradação do atum fresco utilizado na elaboração das conservas. Este índice é calculado com base nas concentrações de histamina, putrescina, cadaverina e espermina e espermidina, através da seguinte equação matemática (Karovicova *et al.*, 2005):

$$\text{Index} = \frac{[\text{Histamina}] + [\text{Putrescina}] + [\text{Cadaverina}]}{[\text{Espermidina}] + [\text{Espermina}]} \text{ [] em ppm}$$

5. Avaliação da qualidade e segurança do pescado

O processo de decomposição do pescado é bastante complexo, tornando-se muito difícil a utilização de apenas um método para avaliação da sua qualidade. Assim, o mais comum é a utilização combinada de vários métodos (Teixeira, 2012).

A qualidade do pescado pode ser determinada por diferentes fatores dos quais se salienta o grau de frescura. Este pode ser avaliado através de métodos físicos, químicos, microbiológicos e sensoriais. Sendo o referido em último o mais utilizado devido à sua fácil execução e compreensão, não requerendo a utilização de equipamentos ou de qualquer estrutura laboratorial e não danificando o pescado.

Porém, este tipo de método exige pessoal treinado e apresenta um carácter subjetivo (Aníbal *et al.*, 2007; Nogueira, 2012; Teixeira, 2012).

Para evitar esta subjetividade é usual a utilização de tabelas de cotação, previamente estabelecidas, numa tentativa de uniformização de critérios de apreciação. Estas tabelas devem ter também em consideração os atributos que melhor caracterizam as alterações de cada espécie (Nogueira, 2012; Teixeira, 2012).

Os métodos físicos, químicos e microbiológicos, apesar de serem bastante objetivos revelam-se, na sua maioria, morosos, destrutivos, dispendiosos e nem sempre traduzem as alterações do pescado tal como são percecionadas (Nogueira, 2012; Teixeira, 2012).

5.1. Métodos sensoriais

Um dos mais recentes e utilizados esquemas de avaliação sensorial do grau de frescura é o método do índice de qualidade (QIM), este tem como objetivo ultrapassar as dificuldades surgidas na aplicação das tabelas da União Europeia. Este método, que ultimamente tem merecido grande atenção por parte da indústria de processamento do pescado e do sector da comercialização, inspeção e investigação, foi desenvolvido em meados de 1980 na *Tasmanian Food Research Unist* (Aníbal *et al.*, 2007; Sant'Ana *et al.*, 2011). O QIM foi desenvolvido, inicialmente, para peixe inteiro armazenado em refrigeração e atualmente tem sido aplicado entre outros produtos, a filetes e a peixe congelado (Teixeira, 2012).

Este método baseia-se na avaliação dos atributos sensoriais que melhor traduzem as alterações *post-mortem* que sucedem no pescado, como por exemplo, o aspeto da pele, a forma dos olhos e a cor das guelras. Para cada um dos atributos é atribuído um conjunto de dois a quatro descritores que melhor refletem as alterações ocorridas. A cada um dos descritores é atribuída uma pontuação, designada por pontos de demérito, que varia entre zero e três. O facto de cada atributo poder ter dois a quatro descritores marca uma das diferenças do QIM em relação às tabelas tradicionais de avaliação do grau de frescura. Outra diferença reside no facto serem utilizados vários descritores específicos para cada produto. Além disso, o grau de frescura do produto em causa não se baseia numa média, mas no número total de pontos de demérito atribuído o qual é designado por índice de qualidade. Os descritores usados para identificar as alterações são, tanto quanto possível inequívocos, claros e breves, envolvendo normalmente apenas uma ou duas palavras-chave (Aníbal *et al.*, 2007; Nunes *et al.*, 2007).

Os descritores correspondentes ao estado de maior frescura são pontuados com zero, enquanto os respeitantes aos estados de degradação mais avançados são cotados com dois ou três. O índice de qualidade máxima do peixe fresco é zero e vai aumentando à medida que a deterioração prossegue. Assim, a curva teórica de evolução dos pontos de demérito inicia-se em zero e o máximo é atingido quando o produto é rejeitado, recorrendo-se normalmente, à análise sensorial do peixe cozido para definição do ponto de rejeição aquando da elaboração da tabela QIM (QIM-Eurofish, 2012; Teixeira, 2012).

Na tabela apresentada de seguida, podemos observar os descritores utilizados para peixes azuis, grupo do qual o atum faz parte (Aníbal, *et al.*, 2007; Nunes, *et al.*, 2007).

*Tabela 3- Parâmetros e critérios para cotação de frescura de peixes azuis (e.g.atum, verdelho, arenque, sardinha, sarda e cavala, anchovas) (Regulamento (CE) nº 2406/96 do Conselho, de 26 de Dezembro) (Aníbal *et al.*, 2007).*

	Critérios			
	Categoria de frescura			
	Extra	A	B	Não admitidos
Pele	Pigmentação viva, cores vivas, brilhantes, irisados; diferença nítida entre superfície dorsal e ventral	Perda de brilho; cores mais baças; menos diferença entre superfície dorsal e ventral	Baça, sem brilho, cores deslavadas; pele plissada quando se dobra o peixe	Pigmentação muito baça; pele a destacar-se da carne
Muco cutâneo	Aquoso, transparente	Ligeiramente turvo	Leitoso	Cinzento amarelado, opaco
Consistência da carne	Muito firme, rígida	Bastante rígida, firme	Ligeiramente mole	Mole (flácida)
Opérculos	Prateados	Prateados, ligeiramente tingidos de vermelho ou de castanho	Escurecimento e extravasações sanguíneas extensas	Amarelados
Olho	Convexo, abaulado; pupila azul-preto vivo, "pálpebra" transparente	Convexo e ligeiramente encovado; pupila escura; córnea ligeiramente opalescente	Chato; pupila enevoadada; extravasações sanguíneas à volta do olho	Côncavo no centro; pupila cinzenta; córnea leitosa
Guelras	Vermelho vivo a púrpura por todo o lado; sem muco	Cor menos viva, mais pálida nos bordos; muco transparente	Em descoloração; muco opaco	Amareladas; muco leitoso
Cheiro das guelras	A algas marinhas frescas; picante; iodado	Ausência de cheiro a algas marinhas; cheiro neutro	Cheiro gordo, um pouco sulfuroso, a toucinho rançoso ou a fruta podre	Extremamente acre

5.2. Métodos químicos

Apesar da avaliação sensorial constituir uma ferramenta muito importante para avaliação da frescura de pescado, os métodos químicos fornecem informação complementar, sendo possível correlacionar a informação. As mudanças que ocorrem no pescado, após a sua morte, são difíceis de ser diferenciadas como sendo consequência de atividades microbianas ou enzimáticas. A espécie do pescado bem

como a classe e quantidade de substâncias nitrogenadas disponíveis nos músculos na forma de aminoácidos livres, peptídeos simples, como anserina e glutatona, TMAO (óxido de trimetilamina), creatina e taurina exercem um importante papel no aparecimento de outros produtos de degradação, uma vez que a sua presença constitui um ponto de partida muito importante para a atividade dos microrganismos (Teixeira, 2012).

Os métodos químicos mais utilizados para a avaliação do pescado são: azoto básico volátil, o azoto de trimetilamina, o valor de K, análises a aminoácidos livres, histamina, piperidina, ácidos orgânicos voláteis, substâncias redutoras voláteis, entre outros (Teixeira, 2012).

5.3. Métodos de deteção das aminas

A determinação histamínica serve como indicador da qualidade e segurança de certos alimentos. Sendo por esse mesmo motivo de grande importância a investigação e desenvolvimento de métodos cada vez mais eficazes na sua determinação e quantificação.

Existem já diversos métodos para a identificação precoce e quantificação de aminas biogénicas, que são utilizados de forma a antecipar da presença desses compostos, evitando casos graves de intoxicação. No entanto, considera-se que a ocorrência desses casos seja geralmente subestimada, não só devido à subnotificação como também pelo erro no diagnóstico (EFSA, 2011; Gomes *et al.*, 2014).

Aqui irá apenas ser feito um breve resumo dos tipos de testes mais utilizados, no entanto, à frente no documento, será descrito com mais pormenor o tipo de teste utilizado durante o estágio.

Do ponto de vista analítico, a deteção de aminas biogénicas nos alimentos, pode ser uma tarefa complicada, pois estas substâncias possuem estruturas químicas muito diferentes umas das outras e intervalos de concentração característicos muito variáveis (EFSA, 2011; Rodriguez *et al.*, 2014).

A deteção e quantificação destas aminas é uma operação analítica complexa devido a fatores como: forte polaridade dos compostos (o que resulta numa maior solubilidade em água e menor nos solventes orgânicos geralmente usados), complexidade das amostras, baixa concentração de aminas nos alimentos e presença de substâncias que possam interferir na determinação (tais como, aminoácidos estruturalmente semelhantes ou presença de aminas estruturalmente muito diferentes no mesmo extrato). Os métodos analíticos baseiam-se na extração e derivatização

das aminas, seguido da sua separação e quantificação. Aqui a extração refere-se à remoção das aminas da matriz alimentar com recurso a solventes orgânicos. O tipo de solvente usado vai ser determinado com base nas características do alimento em questão e no tipo de amina que se pretende detetar (EFSA, 2011; Rodriguez *et al.*, 2014).

Existem diferentes métodos para esta determinação, entre os quais, cromatografia em camada fina, cromatografia gasosa, cromatografia líquida de alta performance, espectrofluorometria, PCR, ELISA e eletroforese. Destes referidos, as técnicas cromatográficas são as mais utilizadas, principalmente a cromatografia líquida de alta performance (HPLC). Estes testes fornecem uma alta resolução, sensibilidade e versatilidade, além de manipulação simples de amostras (Lavizzari *et al.*, 2006; EFSA, 2011; Rodriguez *et al.*, 2014).

5.3.1. Cromatografia líquida de alta performance (HPLC)

Este método analítico apresenta diversas vantagens em relação a outros, uma vez que permite a deteção de diversas aminas em simultâneo. Por essa razão tornou-se o método de referência para a deteção de histamina e outras aminas em alimentos em diversos países. O método permite separações e análise quantitativa de uma grande variedade de compostos presentes em vários tipos de amostras em poucos minutos com alta resolução, eficiência e detetabilidade (Lavizzari *et al.*, 2006). A União Europeia (UE) exige o uso de HPLC para a determinação de histamina em produtos da pesca com finalidade regulatória (CE, 2007; EFSA, 2011; Rodriguez *et al.*, 2014).

5.3.2. Cromatografia em camada fina

Este é um método simples, eficaz e preciso para separação e deteção de aminas biogénicas em diferentes tipos de alimentos (Lázaro De La Torre *et al.*, 2013). É uma técnica de triagem utilizada em indústrias e consiste na separação dos componentes de uma mistura através da migração diferencial numa fina camada de adsorvente colocada numa superfície plana. É um método de execução simples e de baixo custo (Rodriguez *et al.*, 2014).

5.3.3. Cromatografia gasosa

Trata-se de uma técnica, teoricamente, menos dispendiosa e mais rápida que a HPLC, permite ainda a análise de diversas substâncias na mesma amostra e apresenta baixos limites de deteção (Fernandes, 2011; Rodriguez *et al.*, 2014).

No entanto, se o alimento apresentar compostos termicamente instáveis, é necessário obter uma derivada termicamente estável desses compostos, o que nem sempre é possível e torna o tempo de preparação das amostras bastante longo. O facto das aminas biogénicas possuírem baixo peso molecular, alta solubilidade em água e baixa volatilidade é outro obstáculo no uso desta técnica, sendo necessário realizar derivatização dessas aminas para reduzir a polaridade, melhorando a seletividade, a volatilidade, a sensibilidade e a separação dessas aminas. Este processo é caracterizado por banhos condutores a 60°C durante cerca de duas horas. O hidrogénio é o gás transportador mais utilizado (Fernandes, 2011).

5.3.4. Método fluorométrico

O método fluorométrico consiste na extração das aminas com metanol, purificação do extrato em resina de permuta iónica e subsequente reação química com o ortoftaldeído, em meio alcalino adicionando ácido fosfórico. Esta reação forma um composto fluorescente que é analisado num aparelho chamado fluorómetro (EFSA, 2011). Outra forma, capaz de tornar o método mais simples foi desenvolvida para medir as poliaminas, como indicador de decomposição alimentar com fluorómetro usando o éster de N-hidroxissuccinimida do ácido 4- (1-Pirene) butírico (PSE), sendo detetadas poliaminas lineares como putrescina, cadaverina, espermidina e espermina (Rodriguez *et al.*, 2014).

5.3.5. Kits enzimáticos

Existe atualmente a necessidade de recorrer a procedimentos de triagem portáteis e rápidos para análises de campo, por exemplo para produtos de pesca no momento de descarga nos portos. Esta necessidade levou ao desenvolvimento de *kits* portáteis usados para a determinação de aminas biogénicas, usados na análise de perigos e determinação dos pontos críticos de controlo, inseridos no planeamento HACCP.

Com o crescente uso do certificado HACCP por parte da indústria alimentar, nomeadamente indústria transformadora de produtos de pesca, a determinação da

histamina foi incluída como um ponto crítico de controlo, dependendo do produto processado.

Foi então criada a necessidade de recorrer a estes *kits* portáteis para análise da histamina, que não requerem solventes e podem ser facilmente aplicados no meio industrial (Rodriguez *et al.*, 2014; Fenge *et al.*, 2016).

Estes *kits* representam um método rápido, simples e de baixo custo, capaz de apresentar resultados precisos. Os *kits* disponíveis no mercado geralmente são classificados como qualitativos, quantitativos ou semi-quantitativos na faixa de 0 a 500 ppm. Os testes podem ser baseados em dois métodos, o método ELISA que avalia a competição direta de uma substância com a enzima ligada a um número limitado de anticorpos e a análise colorimétrica química em que uma enzima catalisa uma alteração de cor na reação com o substrato (Gan *et al.*, 2013).

5.3.6. Detecção de microrganismos produtores de aminas biogénicas

Inicialmente os métodos microbiológicos para a deteção destas aminas eram baseados no uso *in vitro* de meios de crescimento diferencial com substratos específicos e com indicador de pH com a finalidade de detetar a acumulação de aminas (com a da produção de aminas biogénicas nestes meios existe uma acidificação do meio, que se traduz numa mudança de cor destes). Para além desta técnica referida, existem ainda outras alternativas de deteção *in vitro*, como, a medição de CO₂ dos meios e a análise enzimática ou química das aminas (Marcobal *et al.*, 2006). No entanto estas técnicas baseadas em meios diferenciais nem sempre produzem resultados confiáveis, muitas vezes existe a geração de falsos-negativos ou falsos-positivos, além de também exigir o isolamento e crescimento do microrganismo produtor de aminas, traduzindo-se num procedimento bastante moroso (Marcobal *et al.*, 2006; EFSA, 2011).

Com a caracterização dos genes que codificam as enzimas descarboxilases, específicas para cada amina biogénica, surgiram os métodos baseados em PCR. Estes são métodos bastante sensíveis e específicos que permitem identificar microrganismos com potencial para a produção de aminas biogénicas. Estes testes mostram-se bastante mais rápidos que os demais testes *in vitro*, no entanto, têm como desvantagens, apenas indicar o potencial para a produção de aminas, ainda requerem uma cultura *in vitro*, equipamento e analistas treinados para a extração do DNA, seguida da sua amplificação e deteção dos produtos de PCR. O PCR também foi usado para quantificar e detetar genes de descarboxilase diretamente nos alimentos. No entanto, os fragmentos de PCR amplificados podem sugerir a presença de

microrganismos produtores de aminas biogénicas, mas não permite a identificação do tipo de microrganismo (Marcobal *et al.*, 2006).

6. Sistema de segurança alimentar - HACCP

O sistema HACCP (Hazard Analysis and Critical Control Points) foi desenvolvido nos anos 60 na empresa Pillsbury, pelos laboratórios do Exército dos Estados Unidos e pela NASA com o objetivo de produzir refeições 100 % seguras para os astronautas (Vaz *et al.*, 2000). Este sistema foi inspirado no Programa "Zero Defeitos" da NASA e no Sistema de Análise "Modes of Failures" da U.S. Army Laboratories em Natick, o qual consiste em analisar o processo de produção do produto e perceber em que ponto da sua produção pode acontecer algo que ponha em causa a segurança do produto final (Vaz *et al.*, 2000; ASAE, 2017).

Assim, combinando os princípios de microbiologia dos alimentos com os de controlo da qualidade e da avaliação dos perigos durante a produção de um alimento seguro, foi criado o Sistema de HACCP (*Codex Alimentarius* 2003).

Em 1971 foi apresentado pela Pillsbury a American National Conference for Food Protection e a FDA (Food and Drug Administration) publicou os regulamentos para alimentos enlatados de baixa acidez e acidificados (Vaz *et al.*, 2000; ASAE, 2017).

Em 1980 a OMS (Organização Mundial de Saúde), a ICMSF (Comissão Internacional de Especificações Microbiológicas dos Alimentos) e a FAO (Organização para a Agricultura dos EUA), recomendaram a aplicação deste sistema a empresas alimentares. Em 1993, o Comité da Higiene dos Alimentos da Comissão do *Codex Alimentarius* publicou um guia para a aplicação do Sistema de HACCP. Este guia foi transposto para a legislação comunitária pela Diretiva 93/43 do Conselho de 14 de Junho de 1993, o qual era exigido, de um modo geral a todas as empresas do sector alimentar (ASAE, 2017).

Finalmente em 2006, o Regulamento (CE) nº853/2004, do Parlamento Europeu e do Conselho, de 29 de Abril de 2004, relativo à higiene dos géneros alimentícios, e que revoga a Diretiva 93/43/CEE, estipula, no seu artigo 5º, que todos os operadores do sector alimentar devem criar, aplicar e manter um processo ou processos permanentes baseados nos 7 princípios do HACCP (ASAE, 2017).

Esta ferramenta tem um carácter sobretudo preventivo, sendo que o objetivo é aplicar medidas que garantam um controlo eficiente durante todo o processamento, identificando pontos e etapas onde se podem controlar os perigos que possam existir,

em vez de inspeções centradas no produto final. De forma a aumentar a sua eficiência, este sistema é específico para cada produto e para cada linha de produção dependendo, por isso, das condições particulares de cada fábrica (*Codex Alimentarius 2003*).

Para além de melhorar a segurança dos alimentos, a implementação do HACCP poderá oferecer outras vantagens significativas, facilitar a inspeção por parte das entidades regulamentadoras e aumentar o comércio internacional ao aumentar a confiança na segurança dos alimentos (*Codex Alimentarius 2003*).

Segundo o *Codex Alimentarius (2003)*, a aplicação do HACCP compreende 7 princípios:

1º- Análise de perigos: identificação dos potenciais perigos que possam ocorrer em todas as fases do processo;

2º- Determinação de pontos críticos de controlo (PCC): pontos que podem ser controlados para minimizar a ocorrência do perigo ou eliminá-lo totalmente;

3º- Estabelecimento de limites críticos: valores ou critérios que diferenciam a aceitação da não-aceitação do processo;

4º- Estabelecimento do sistema de monitorização: vigiar o controlo dos PCC por meio de testes ou observações periódicas;

5º- Estabelecimento de ações corretivas: caso algum PCC esteja fora do controlo, devem ser tomadas medidas corretivas;

6º- Estabelecimento de procedimentos de verificação: aplicação de métodos, testes e outros procedimentos para avaliar o cumprimento e a eficácia do plano HACCP implementado;

7º- Documentação e registo: organização da documentação pertencente a todos os procedimentos e registos referentes ao processo;

Baseando-se nestes sete princípios, é implementado um plano HACCP que segue uma metodologia de 12 etapas. Inicialmente organiza-se uma equipa HACCP, descreve-se o produto, o fim a que se destina, realiza-se o fluxograma que demonstre

todas as etapas e processos do fabrico do produto em questão e valida-se este fluxograma no terreno (*Codex Alimentarius 2003*).

7. Objetivo e enquadramento do estágio

O estágio na fábrica de conservas La Gondola teve uma duração de 8 meses. Durante esse período estabeleceram-se como principais objetivos aquisição de conhecimentos e experiência sobre o funcionamento de uma fábrica de conservas e de transformação de atum, incluindo o conhecimento de todo o processo industrial e produtivo, as matérias-primas, produtos finais e potenciais mercados, sempre mais focado no processamento do atum. Para além da familiarização com o ambiente fabril, pretendeu-se também obter formação, em termos académicos e profissionais, na área de segurança alimentar e avaliação da qualidade do pescado, com particular incidência da avaliação da temperatura e do tempo de processamento na qualidade e segurança final da matéria-prima (lombos de atum), com foco no potencial desenvolvimento de histamina.

A segunda parte deste relatório centra-se nas tarefas desenvolvidas no laboratório de controlo de qualidade da fábrica, e nos procedimentos utilizados para a avaliação da qualidade da matéria-prima durante o processamento.

8. A empresa

A Fábrica de Conservas La Gondola foi fundada por italianos que trouxeram para Matosinhos, norte de Portugal, as primeiras indústrias de conservas, em 1940. Investindo numa nova unidade nos anos 80, a La Gondola decidiu arrojarse para uma produção de conservas diversificada. As linhas de orientação da empresa mantêm-se nos produtos de elevada qualidade. Com o início do séc. XXI, o crescimento de espaços gourmet tornou os produtos da marca cada vez mais procurados e apetecíveis em variados mercados. Cerca de 80 % dos produtos fabricados destinam-se ao mercado de exportação, encontrando-se presente em múltiplos países, abraçando vários continentes.

No final do ano 2016 a empresa La Gondola cessou, temporariamente, a produção de conservas dedicando-se exclusivamente à transformação de atum. As suas conservas continuam, no entanto, a ser produzidas na empresa de conservas A Poveira, empresa à qual a La Gondola se associou nos últimos anos.

8.1. Fluxograma das atividades desenvolvidas diariamente na empresa

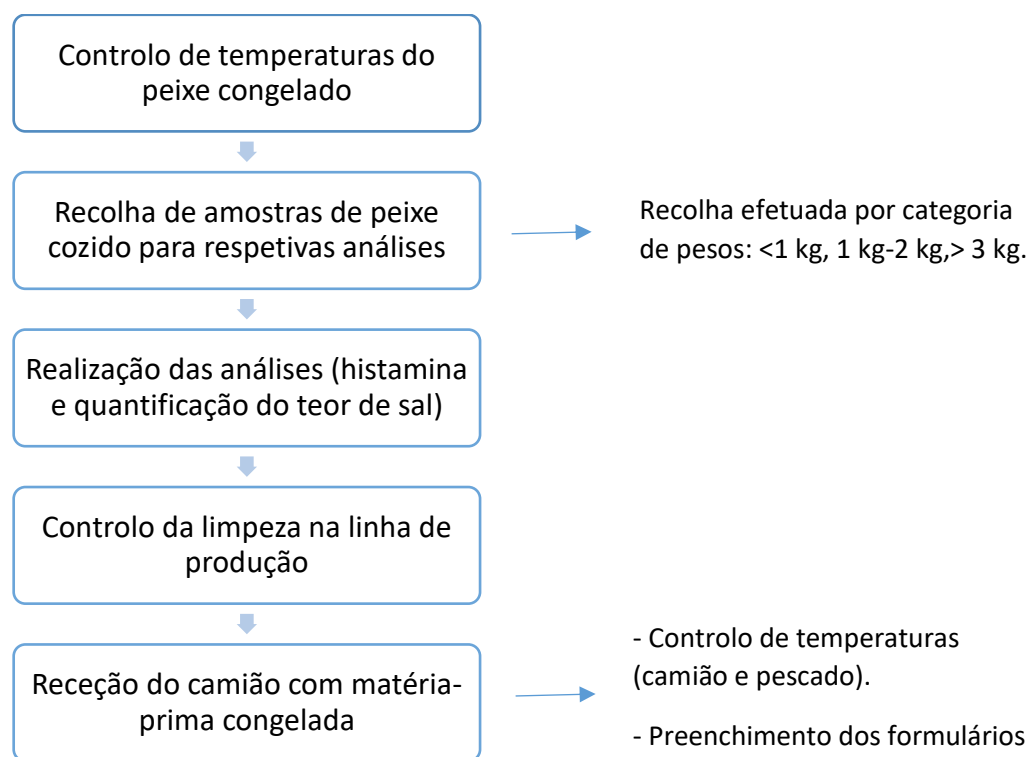


Figura 1-Fluxograma das atividades desenvolvidas diariamente na empresa

8.2. Espécies de atum

Os tunídeos, designação genérica da numerosa família pertencente aos escombrídeos, são uma família com espécies marinhas pelágicas migratórias que se organizam em cardumes nos oceanos Atlântico, Pacífico e Índico. A sua alimentação é bastante diversificada, podendo-se alimentar de uma grande variedade de peixes, crustáceos e cefalópodes. A época reprodutora decorre nos meses de Verão e o tamanho e peso dos adultos é muito variável, dependendo do tipo de atum, situando-se, normalmente, entre os 2 e os 8 kg para os tunídeos menores (bonito e gaiado), e entre os 20 e os 40 kg para os de maior tamanho (atum albacora e outros tunídeos), podendo os gigantes da família, os atuns rabilhos, atingir 700 kg (DGPA, 2008; Costa, 2013).

A grande importância comercial atribuída ao atum advém em parte à sua capacidade de formar cardumes, já que desta forma pode ser capturado em maior quantidade e em menor tempo (DGPA, 2008).

A composição química do músculo do atum, no que diz respeito aos macronutrientes, é aproximadamente, 69 % de água, 4 % de lípidos, 25,2 % de

proteínas e 1,3 % de cinzas. Quanto aos principais micronutrientes, apresenta na sua composição uma quantidade significativa de fósforo (250 g/100 g de tecido) e de iodo, bem como uma pequena quantidade de tecido conjuntivo que o torna mais digerível (Nogueira, 2012).

A espécie de atum mais usado como matéria-prima na empresa La Gondola é o popularmente conhecido como bonito listrado ou gaiado, o *Katsuwonus pelamis* ou *Skipjack*. Outra espécie utilizada ocasionalmente pertence à espécie *Thunnus albacares*, sendo este último utilizado na produção do atum claro (Nogueira, 2012).

9. Fluxograma lombeira de atum

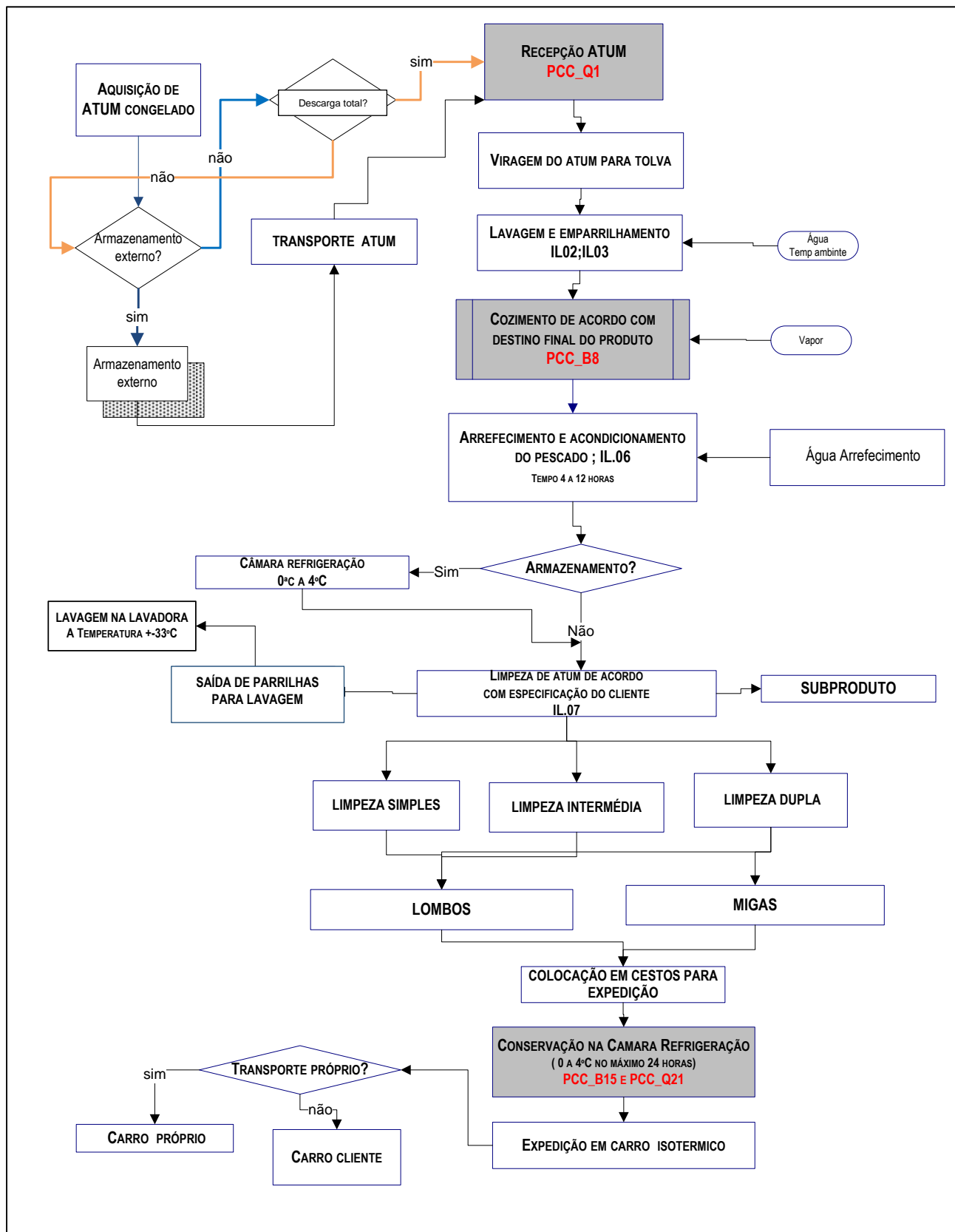


Figura 2- Fluxograma Lombeira (retirado do manual de HACCP empresa).

De seguida serão descritas com mais pormenor as principais etapas do fluxograma nas quais o departamento de controlo de qualidade intervém.

9.1. Receção da matéria-prima

Nesta etapa eram realizadas várias operações de forma a verificar a qualidade da matéria-prima e a manutenção da mesma. É nesta etapa que surgem também os primeiros pontos críticos de controlo. Estas operações são da responsabilidade do departamento de controlo de qualidade, que deve estar presente aquando a chegada do camião com a matéria-prima, sendo nessa altura realizadas as seguintes operações:

1º Inspeção do camião

Inspeção do camião de forma a verificar a existência ou não de contaminantes que possam afetar o pescado durante a descarga.

Inspeção da área de descarga de forma a garantir que esta se encontrava limpa, sem resíduos e isenta de contaminantes que possam interferir na qualidade do pescado.

Inspeção das caixas de transporte (caixas de plástico) do pescado de forma a verificar se estas estão limpas e secas, sem resíduos e em boas condições.

2º Amostras de matéria-prima

Durante a descarga do camião, eram recolhidas amostras de peças de diferentes tamanhos, que eram deixadas a descongelar para posterior análise organolética e de histamina.

Durante a descarga eram feitas também medições de temperatura, de forma a verificar se o pescado se encontrava a uma temperatura de pelo menos -10°C . Para tal fazia-se uma perfuração em alguns exemplares de atum, com o auxílio de um perfurador metálico, junto das barbatanas dorsais. Essa perfuração deveria ter uma profundidade aproximada entre 5 a 15 cm, dependendo do tamanho do peixe, para que a temperatura pudesse ser medida próxima da espinha, com o recurso à sonda metálica do termómetro. Estas temperaturas eram devidamente registadas no respetivo boletim.

3º Recolha das amostras

Eram recolhidas amostras de aproximadamente 20 peixes de diferentes locais do camião, porta de descarga, meio e traseira do camião.

Após as amostras descongelarem era feita a análise sensorial, que consistia em avaliar as características relacionadas com a cor, o odor, a pele, os olhos e a barriga (ver tabela 4). Eram então atribuídas notas de 0 a 3, onde 3 é o pescado ótimo e 0 inadequado ou não admitido. O resultado da análise sensorial era registado e realizava-se o cálculo do índice de frescura. Para tal, eram somadas as notas parciais atribuídas a cada categoria, estas eram divididas pela multiplicação do número de características examinadas pelo número de amostras avaliadas. O resultado obtido era analisado de acordo com os valores: > 2,70 era considerado pescado Extra; entre 2,69 e 2,00 classificado como pescado de categoria A; categoria B para os valores de 1,99 a 1; e <1 classificado com categoria C. Se o resultado fosse B, o lote era retido e mais amostras eram recolhidas para uma nova análise e se o resultado fosse C, as amostras eram devolvidas ou descartadas.

Tabela 4 - Características avaliadas à chegada da matéria-prima (tabela retirada do manual de HACCP empresa)

	Extra	A	B	Não Admitido
Pele	Pigmentação viva, cores vivas, brilhantes, irisadas, diferença nítida entre a superfície dorsal e ventral	Perda de brilho, cores mais baças; menos diferença entre superfícies dorsal e ventral	Baça sem brilho, cores deslavadas; pele plissada quando se dobra o peixe	Pigmentação muito baça; pele a destacar-se da carne
Muco Cutâneo	Aquoso, transparente	Ligeiramente turvo	Leitoso	Cinzentos, amarelado, opaco
Consistência da Carne	Muito firme, rígida	Bastante rígida, firme	Ligeiramente mole	Mole flácida
Opérculos	Prateados	Prateados, ligeiramente tingidos de vermelho ou de castanho	Escurecimento e extravasões sanguíneas externas	Amarelados
Olho	Convexo, abaulado, pupila azul-preto viva, pálpebra transparente	Convexo e ligeiramente encovado, pupila escura, córnea ligeiramente opalescente	Chato, pupila enevoada, extravasões sanguíneas à volta do olho	Côncavo no centro, pupila cinzenta; córnea leitosa

Após a análise sensorial, era também feita a análise da histamina segundo os critérios de aceitação para os valores da histamina à chegada de acordo com o Regulamento (CE) nº 2073/2005 de 15 de Novembro. O pescado era considerado aceitável com valores de histamina inferiores a 50 ppm, sendo rejeitado de imediato se os valores registados forem superiores a esse valor.

Nesta etapa existe um PCC (ponto crítico de controlo) de natureza química por existir o risco da presença de histamina, em valores superiores aos máximos estabelecidos. Nesta etapa, a presença de histamina, é resultado de possíveis abusos de temperatura, quer durante o transporte quer durante o período decorrente entre a captura do pescado e a sua congelação.

9.2. Cozedura do atum

A empresa possui 2 fornos para cozimento a vapor do atum, cada um acomodando sete carros. A temperatura dos fornos para o cozimento do pescado era de 92°C, e a pressão de 1 atm. O tempo de cozimento do pescado vai ser diretamente proporcional ao seu tamanho, ou seja, quanto maior o pescado, maior o tempo de cozimento (podendo variar entre 45 minutos a 3 horas). A temperatura final aferida na espinha é também dependente do tamanho dos peixes e da finalidade a que se destina a matéria-prima, no caso de se tratar de peixe grande, por exemplo, a temperatura na espinha deverá estar entre os 60°C e os 67°C.

Após a saída do cozedor, o arrefecimento do atum era feito com recurso a ciclos de água, o número de ciclos é estimado com base no tamanho e consistência do pescado, e eram feitos até este atingir os 30°C na espinha. Os cestos com o atum permaneciam nesta zona até seguirem para a linha de limpeza, até um período máximo de 12h.

Nesta etapa existem três PCC, dois de natureza biológica (contaminação do pescado por parasitas presentes nas vísceras do mesmo e contaminação por *Clostridium botulinum*, *Yersinia enterocolitica* e *Staphylococcus aureus*), sendo que estes perigos biológicos são eliminados caso a cozedura seja bem-sucedida. O outro PCC é de origem química, tratando-se novamente do risco de desenvolvimento de histamina, devido a abusos de temperatura que possam existir.

9.3. Recolha de amostras de atum cozido

Depois de cozido e arrefecido eram recolhidas aproximadamente 18 amostras de peixes com diferentes tamanhos para análise organolética (cor, sabor, textura e odor) e era verificada a presença de algum contaminante (físico, químico ou biológico).

O atum cozido ao qual não era realizada a limpeza no próprio dia, era armazenado em câmara de refrigeração. No dia seguinte antes de esse atum seguir para a linha de limpeza, eram recolhidas algumas amostras para a realização da análise à histamina.

9.4. Limpeza do atum

A limpeza do atum era feita de acordo com as especificações do cliente e divide-se em 3 tipos, limpeza simples, limpeza intermédia e limpeza dupla.

É importante nesta etapa existir um controlo dos defeitos deixados pelas operadoras nos cestos com os lombos e migas de atum, isto é, eram revistos aproximadamente 35 cestos/ hora, e de forma aleatória onde era verificado a presença e abundância de espinhas, peles e escamas, ou a presença de sangacho e oxidação (estes últimos parâmetros estão diretamente dependentes do tipo de limpeza solicitado, uma vez que a limpeza simples tolera a presença de algum sangacho e oxidação e a limpeza dupla não tolera qualquer tipo de defeito).

Os cestos com os lombos de atum já limpos eram armazenados numa câmara de refrigeração até sua expedição e num prazo máximo de 24h.

Durante o seu armazenamento, existem dois PCC, um de origem biológica, devido ao risco de contaminação microbiológica após o cozimento e outro de origem química, a continuação do desenvolvimento de histamina.

10. *Histamine ELISA* - imunoensaio enzimático para a determinação quantitativa da histamina nos alimentos

A determinação da histamina foi efetuada de acordo com as instruções incluídas no *kit* de ELISA comercial utilizado (RIDASCREEN® Histamin, R-Biopharm AG, Darmstadt, Germany).

Este tipo de método tem por base a ligação antígeno-anticorpo, permitindo a deteção de pequenas quantidades de anticorpo ou de antígeno, como sejam, proteínas, péptidos e hormonas. A marcação enzimática permite a deteção do analito através da determinação da intensidade de degradação do respetivo substrato. No caso do método usado no laboratório de controlo de qualidade da empresa, a superfície dos poços é revestida com uma quantidade conhecida de anticorpos (anticorpo de captura) para detetar o antígeno pretendido (Gan *et al.*, 2013), neste caso a histamina.

As amostras que contêm o antígeno em estudo são adicionadas aos poços da placa. De seguida é adicionado o anticorpo de sinalização, marcado com uma enzima, e com afinidade para outro determinante antigénico diferente do determinante antigénico reconhecido pelo anticorpo de captura. A ligação do anticorpo-antígeno é observada através da coloração da amostra (a amostra perde a cor azulada e toma uma cor amarela-esverdeada) que é quantificada (Gan *et al.*, 2013). A concentração de histamina é diretamente proporcional à intensidade de cor da amostra em teste.

10.1. Amostragem e preparação das amostras

As amostras eram recolhidas diariamente durante os oito meses decorrentes do estágio. Eram recolhidas cerca de 18 amostras, de forma aleatória, de atum cozido e/ou congelado (caso se estivesse a realizar análises a atum cozido e congelado, as amostras eram processadas em separado). Depois da recolha, as amostras eram homogeneizadas com o auxílio de um almofariz e pesados cerca de $5\text{ g} \pm 0,001\text{ g}$ para um tubo de centrífuga, aos quais eram adicionados 50 mL de água destilada, estes eram posteriormente transferidos para um banho-maria, a 100°C, onde permaneciam durante 20 minutos. Após esse período as amostras eram deixadas a arrefecer à temperatura ambiente. Depois dessa etapa, eram retirados cerca de 2 mL de amostra que eram transferidos para microtubos de centrífuga e centrifugados durante 3 minutos.

10.2. Procedimento para a derivatização

O *kit* vem equipado com 6 soluções padrão de diferentes concentrações de histamina (0; 2; 4; 10; 40; 100 mg/L). Estas eram preparadas adicionando 100 µL de cada solução-padrão aos poços da microplaca; a cada poço com o respetivo padrão eram adicionados 150 µL do tampão de derivatização; agitava-se suavemente a placa e era incubada durante 15 minutos à temperatura ambiente (20 - 25°C).

10.3. Procedimento para o método de ELISA

Inseria-se um número suficiente de microplacas em duplicado para as soluções padrão, controlo e amostras. Em simultâneo à preparação dos padrões era também feita a preparação das amostras. Aos poços correspondentes a cada amostra, eram adicionados 150 µL de solução tampão juntamente com 100 µL de amostra. Esta mistura era agitada, suavemente, e deixada a incubar durante 3 minutos à temperatura ambiente. Após esse período era feita a primeira leitura no fotómetro, a 450 nm de absorvância. Depois da primeira leitura eram adicionados, a todos os poços, 10 µL de enzima (anticorpo de sinalização). Esta mistura era novamente agitada suavemente e deixada a incubar durante 10 minutos, período após o qual era feita a leitura final, a 450 nm.

10.4. Quantificação da histamina

Os valores de absorvância obtidos eram inseridos no programa informático, RIDASOFT®, disponibilizado pelo mesmo fornecedor do *kit*.

Neste *software*, era construída uma curva de calibração das seis concentrações-padrões (0; 1; 5; 10; 15; 20 mg/L). A absorvância de cada padrão e amostras eram convertidas em percentagem de absorvância, considerando que a solução padrão 0 mg/kg correspondia a um sinal de 100%. Os valores obtidos eram introduzidos num gráfico de regressão linear. No final o *software* automaticamente convertia estes resultados em mg/L, sendo que o limite de deteção (segundo o fabricante) era de 2 ng/mL, ou seja, 0,002 mg/L.

Histamine (enzymatic)
13. Jun. 2017, 11:31:09, Linear Regression, Ser.No: 1234, Version: 1.93

Ser. No.	Concentration mg/L	Standards				Residuals (Absorbance)	
		Absorbance (#1) (#2) (Mean)	(CV) %			(#1)	(#2)
1	0.00	-0.022 0.000 -0.022	0.0			-0.061	-0.039
2	1.00	0.139 0.000 0.139	0.0			0.009	-0.130
3	5.00	0.552 0.000 0.552	0.0			0.057	-0.495
4	10.00	0.995 0.000 0.995	0.0			0.043	-0.952
5	15.00	1.384 0.000 1.384	0.0			-0.025	-1.409
6	20.00	1.842 0.000 1.842	0.0			-0.023	-1.865

Ser. No.	ID	Absorbance (Mean) (CV)		Samples calculated mg/L	mg/kg		
					*	=	
1	sk098_17 (1-2kg)	0.055	0.0	0.177	25.00		<LoQ
2	sk098_17 (2-3kg)	0.071	0.0	0.353	25.00		<LoQ
3	sk098_17 (>3kg)	0.072	0.0	0.364	25.00		<LoQ

Figura 3 - Exemplo de resultados obtidos após a inserção dos valores de absorvância obtidos no *software* RIDASOFT®.

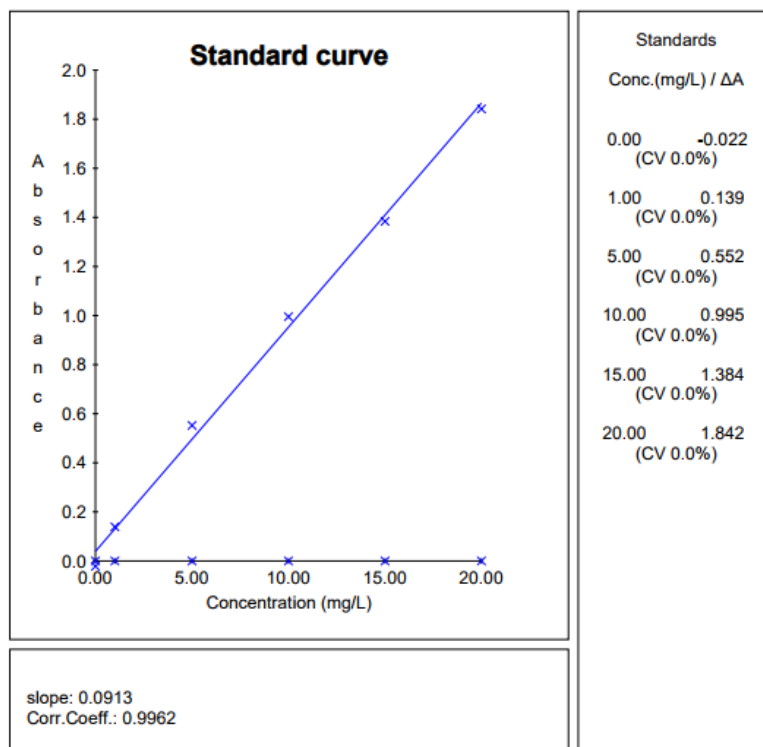


Figura 4- Exemplo de curva de calibração.

11. Determinação do teor de cloreto de sódio

O atum rececionado era previamente congelado em salmoura, ainda em alto mar, como processo de conservação do pescado nos barcos de pesca. Uma vez que os valores da salmoura não eram disponibilizados era necessário a realização da quantificação dos valores de cloreto de sódio em cada lote após cozedura a vapor, sem qualquer adição de sal.

11.1. Amostragem e preparação das amostras

Após a cozedura diária, estipulada para esse dia do lote que se encontrava a ser trabalhado, eram recolhidas amostras de forma aleatória, no total de 10, normalmente por categoria de peso (pescado até 1 kg, pescado entre 1-2 kg e pescado com mais de 3 kg) sendo estas amostras analisadas em separado.

As amostras eram homogeneizadas e pesados cerca de $2\text{ g} \pm 0,0001\text{ g}$ diretamente para *Erlenmeyers* ou balões cónicos, aos quais se adicionava também 20 mL de ácido nítrico ($\rho_{20}=1,40\text{ kg/L}$) e 10 mL de solução de nitrato de prata 0,1 N. Esta mistura era aquecida, sobre uma placa de indução, até levantar fervura; permanecendo assim durante 15 minutos até se verificar a dissolução de todos os sólidos.

Após os 15 minutos as amostras eram deixadas a arrefecer até atingirem a temperatura ambiente, período após o qual eram adicionados 50 mL de água destilada e 5 mL de solução saturada de sulfato de ferro e amónio (indicador de mudança de cor).

Para a preparação do branco o procedimento era idêntico ao das amostras, mas sem a adição do pescado.

11.2. Titulação

A titulação era feita solução de tiocianato de amónio 0,1 N até ao aparecimento de uma coloração laranja claro persistente. No final era anotado o volume de tiocianato de amónio gasto e era calculado o teor de cloreto de sódio com base na equação apresentada de seguida. A titulação do branco era feita com base no mesmo procedimento.

$$\text{Teor de NaCl} = \frac{0,5845 \times (v1 - v2) \times N}{m} \left[g \frac{\text{NaCl}}{100 g} \text{ amostra} \right] \text{ onde,}$$

V1- representa o volume, expresso em mililitros, da solução de tiocianato de amónio de título conhecido, gasto na titulação do branco;

V2- representa o volume, expresso em mililitros, da solução de tiocianato de amónio de título conhecido, gasto na titulação da amostra;

N- representa a concentração, expressa em normalidade, da solução de tiocianato de amónio;

m- representa a massa, expressa em grama, da toma para análise;

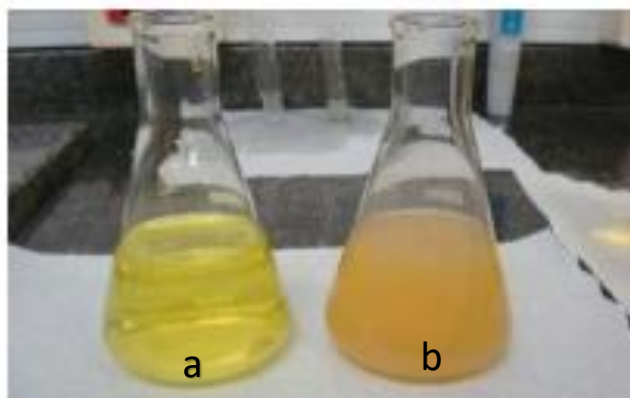


Figura 5- Exemplo de soluções antes (a) e depois (b) da viragem de cor que indica o fim da titulação

12. Discussão

O método usado para a deteção e quantificação da histamina durante todo o estágio foi o método de ELISA (de competição). Este é um método muito útil, não só para a indústria médica (Gan *et al.*, 2013) como também para a indústria alimentar (Asensio *et al.*, 2008), já que permite a deteção de todos os tipos de moléculas biológicas em concentrações e quantidades muito baixas (Gan *et al.*, 2013).

A principal vantagem do ELISA de competição é a sua alta sensibilidade às diferenças de composição em misturas de antigénios complexas, mesmo quando o anticorpo de deteção específico está presente em quantidades relativamente baixas (Gan *et al.*, 2013). Este método pode ser usado para determinar a existência de alergénios em diversos tipos de alimentos, como carne, peixe e queijo (Asensio *et al.*, 2008).

Durante o estágio não se registou nenhuma ocorrência de histamina acima da concentração máxima estabelecida na legislação portuguesa, apesar das análises serem feitas diariamente. No anexo 1, podem-se consultar alguns resultados obtidos durante os meses de março e abril.

De acordo com diferentes autores a utilização de peixe de má qualidade, bem como o incorreto manuseio durante o processamento são das principais causas para a ocorrência de histamina em concentrações elevadas (Tahmouzin *et al.*, 2011; Mahusain *et al.*, 2016).

Considera-se que um peixe de boa qualidade apresente menos de 10 mg/kg de histamina. Entre os 10 e 30 mg/kg o peixe já apresenta uma deterioração significativa. Acima dos 50 mg/kg o peixe já apresenta uma evidente decomposição (CE, 2007; EFSA, 2011).

O pescado fresco deve ser conservado em gelo ou em câmaras de refrigeração a 4°C. O peixe congelado deve ser armazenado, sempre que possível, em câmaras de refrigeração até ao seu processamento (FAO, 2013).

Cabe às indústrias a implementação de medidas de controlo de qualidade rigoroso, como por exemplo o sistema de HACCP, seguindo todos os passos e respeitando os pontos críticos de controlo, durante todas as etapas do processamento, de forma a garantir a qualidade dos produtos finais e rejeitando o pescado em más condições e/ou contaminado.

Algumas evidências sugerem que existem variações sazonais da concentração de aminas biogénicas nos peixes. Sendo registados valores mais elevados durante a primavera e verão, comparativamente com o outono e inverno (FAO, 1985). As concentrações também variam consoante as espécies, condições de captura e higiene

durante o transporte e armazenamento, bem como as condições de refrigeração a que o pescado é sujeito (FAO, 1985). Pelas razões referidas, mesmo antes da descongelação e quando o pescado apresenta sinais óbvios de mau manuseamento, como olhos muito vermelhos, pele em mau estado e corpo com deformações (Aníbal *et al.*, 2007), devem ser feitas de imediato análises de quantificação de histamina, pois são sinais de possíveis abusos de temperatura durante o armazenamento no barco de captura ou durante o transporte.

No que diz respeito ao atum, há um aumento do risco da ocorrência de níveis tóxicos de aminas, em particular de histamina, pois trata-se de uma espécie de pescado particularmente rica em histidina livre nos músculos que é convertida em histamina no processo *post-mortem*. Este processo é acelerado quando as condições de armazenamento não são as mais corretas e também em caso de incorreto manuseamento durante o seu processamento (Mahusain *et al.*, 2016).

13. Conclusão

O estágio na empresa La Gondola teve como objetivos, em primeiro lugar, proporcionar contacto com o mundo industrial e com todas as atividades diárias associadas ao funcionamento de uma fábrica de conservas; em segundo lugar, teve como objetivo mais preciso a avaliação da influência da temperatura e do tempo de processamento na qualidade e segurança final da matéria-prima (lombos de atum).

Esta avaliação passou, em grande parte, pelas análises diárias aos valores de histamina, de forma a controlar a qualidade da matéria-prima durante todas as fases do processamento.

O principal problema com a histamina prende-se com o facto de esta não ser eliminada no processo de pasteurização e esterilização (processos utilizados na produção de conservas de peixe), visto esta ser muito estável ao calor.

O consumo de conservas, nomeadamente de atum, tem vindo a aumentar ao longo dos anos, é por isso essencial que haja um controlo contínuo da concentração de histamina no produto ao longo de toda a cadeia de processamento, uma vez que se trata de um alergénio prejudicial para consumidores sensíveis a esta substância. Níveis acima do permitido podem provocar um grave problema de saúde pública.

Assim sendo, os parâmetros de qualidade e segurança alimentar exigidos a uma empresa do ramo alimentar, neste caso, empresas ligadas ao comércio de peixe têm de cumprir, rigorosamente, as normas exigidas por lei.

14. Bibliografia

- Alfama, P. (2009). Quality Index Method (QIM) for frozen-thawed Atlantic Mackerel (*Scomber scombrus*) stored in ice: Development and Application in a shelf life study. Fisheries training programme.
- Aníbal, J., Esteves, E. (2007). Quality Index Method (QIM): utilização da Análise Sensorial para determinação da qualidade do pescado. Escola Superior de Tecnologia da Universidade do Algarve.
- ASAE, www.asae.pt. Acedido a: 13.05.2017.
- Asensio, L., González, I., García, T., Martín, R., (2008). Determination of food authenticity by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Food Control. Volume 19, Issue 1 (1-8). DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2007.02.010>.
- Bai, J., Rai, V. (2014). Microbial Food Safety and Preservation Techniques. Acedido a: 10/07/2017. DOI: https://books.google.pt/books?id=9MzMBQAAQBAJ&printsec=frontcover&hl=pt-PT&source=gbs_atb#v=onepage&q&f=false.
- Bronzwaer, S. (2008). EFSA scientific forum “from safe food to healthy diets”. EU risk S2 assessment – Past, present and future. *Trends in Food Science & Technology* 19: S2-S8.
- Cardozo, M., Lima, C., França, C., Lima, S. (2013). Aminas Biogênicas: Um Problema de Saúde Pública. *Revista Virtual Quim.* 5 (2), 149-168.
- Chong, C. Y., Abu Bakar, F., Russly, A. R., Jamilah, B. & Mahyudin, N. A. (2011). The effects of food processing on biogenic amines formation. *International Food Research Journal* 18 (3): 867-876.
- Codex Alimentarius (2003). (Versão Portuguesa, CAC/RCP 1-1969 Rev. 4). FAO/WHO Food standards.
- Costa, L. M. (2013). O atum em Portugal de 1896 a 2011: Contributos para a sua história ambiental, ecológica e económica. Dissertação de mestrado em Ecologia e Gestão Ambiental. Universidade de Lisboa.
- Criado, P., Criado, F., Maruta, C., Filho, C. (2010). Histamine, histamine receptors and antihistamines: new concepts. *Anais Brasileiros de Dermatologia* vol. 85 (2):195-210. DOI 10.1007/s12016-015-8467-x.
- EFSA (2011). EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ). Scientific Opinion on risk based control of biogenic amine formation in fermented foods. DOI: 10.2903/j.efsa.2011.2393.

- Eom, J., Seo, B. and Choi, H. (2015). Biogenic Amine Degradation by *Bacillus* Species Isolated from Traditional Fermented Soybean Food and Detection of Decarboxylase-Related Genes. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, vol. 25, nº9: 1519-1527. DOI: 10.4014/jmb.1506.06006.
- FAO/WHO (Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization). (2013). Public Health Risks of Histamine and other Biogenic Amines from Fish and Fishery Products. Meeting report.
- Feng, C., Teuber, S., Gershwin, M. (2016). Histamine (Scombroid) Fish Poisoning: a Comprehensive review. *Clinic Rev Allerg Immunol* 50:64 – 69.
- Fernandes, J. O. (2001). Desenvolvimento de metodologias de cromatografia gasosa – espectrometria de massa para a determinação de aminas biogénicas em vinhos do Porto e em mostos. *Dissertação de doutoramento*. Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto. Porto. 494 p.
- Food and Drug Administration (FDA) (2011). Fish and Fishery Products Hazards and Controls Guidance Fourth Edition.
- Frank, H., Yoshinaga, D. (1987). Table for estimating histamine formation on *Skipjack Tuna*, *Katsuwonus pelamis*, at low nonfreezing temperatures. Journal series no. 3189, Institute of Tropical Agriculture and Human Resources.
- Gan, Stephanie D., Patel, Kruti R. (2013). Enzyme Immunoassay and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Journal of Investigative Dermatology*. 133, p. 1-3.
- García-Tapia, G., Barba-Quintero, G., Gallegos-Infante, J., Pacheco Aguilar, R., Ruíz-Cortés, J., Ramírez, J. (2013). Influence of physical damage and freezing on histamine concentration and microbiological quality of *yellowfin tuna* durin processing. *Food Science and Technology* 33 (3): 463-467. Campinas. DOI: <http://d.doi.org/10.1590/S0101-20612013005000061>.
- Gingerich, T. (1998). Biogenic Amine Analysis of Fresh and Stored *Bluefish* (*Pomatomus saltatrix*) and Microbiological Survey of Histamine-forming Bacteria. *Tese de Mestrado em Ciências e Tecnologia Alimentar*. Faculty of the Virginia Polytechnic Institute and State University.
- Gomes, M., Pires, B., Fracalanza, S., Marin, V. (2014). O risco das aminas biogénicas nos alimentos. *Ciência & Saúde Coletiva*, vol. 19 (4):1123-1134. DOI: 10.1590/1413-81232014194.18672012.
- Gouveia, N. (2009). Desenvolvimento de uma Metodologia Analítica para Determinação de Aminas Biogénicas em Tunídeos. *Dissertação de Mestrado em Bioquímica Aplicada*. Universidade da Madeira.
- Guia de Identificação dos Atuns do Atlântico. (2008). Ministério da Agricultura, do desenvolvimento rural e das pescas. Departamento-Geral das Pescas e Agricultura.

- Hattori, Y., Seifert, R. (2017). Histamine and Histamine Receptors in Health and Disease. Acedido a: 09-07-2017. DOI: <https://books.google.pt/books?id=2NQkDwAAQBAJ&printsec=frontcover&hl=pt-PT#v=onepage&q&f=false>.
- Hungerford, J. (2010). Scombroid poisoning: A review. *Toxicon*, Vol. 56, Issue 2: 107-258. DOI: 10.1016/j.toxicon.2010.02.006.
- Huss, H. H. (1995). Quality and quantity changes in fresh fish. *FAO Fisheries Technical paper* 348. Rome, 195pp. DOI: <http://www.fao.org/docrep/v7180e/V7180E11.htm>.
- Huss, H. H., Abadouch, L., Gram, L. (2004). Assessment and management of seafood safety and quality. *FAO Fisheries Technical Paper 444*, Rome, 266pp.
- Huss, H.H. (1997). Garantia da qualidade dos produtos da pesca. *FAO Documento Técnico sobre as Pescas*. Nº. 334. Roma, 176p. DOI: <http://www.fao.org/docrep/003/t1768p/T1768P04.htm>.
- Karovicova, J., Kohajdova, Z. (2005). Biogenic Amines in Food. *Chemical Papers*, vol.59 (1): 70-79.
- Koohdar, V. A., Razavilar, V., Motalebi, A. A., Mosakhani, F., Valinassab, T. (2011). Isolation and Identification of Histamine-forming bacteria in frozen *Skipjack tuna (Katsuwonus pelamis)*. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, vol. 10 (4): 678-688.
- Kordiovská, P., Vorlová, L., Borkovcová, I., Karpíšková, R., Buchtová, H., Svobodová, Z., Křížek, M., Vácha, F. (2006). The dynamics of biogenic amine formation in muscle tissue of carp (*Cyprinus carpio*). *Czech Journal of Animal Science* vol. 51 (6): 262-270.
- Lavizzari, T., Veciana-Nogues, T., Bover-Cid, S., Marine-Font, A. & Vidal-Carou, M. (2006). Improved method for the determination of biogenic amines and polyamines in vegetable products by ion-pair high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1129: 67–72. DOI: 10.1016/j.chroma.2006.06.090
- Lázaro De La Torre, C., Conte-Júnior, C. (2013). Chromatographic methods for biogenic amines determination in foods of animal origin. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.*, São Paulo, v. 50, n. 6, p. 430-446.
- Leal, L. (1997). Um Sistema de Análise dos Riscos e dos Pontos de Controlo Críticos, numa Unidade de Restauração Pública. Universidade do Porto.
- Lee, Y., Kung, H., Wu, C., Hsu, H., Chen, H., Huang, T., Tsai, Y. (2015). Determination of histamine in milkfish stick implicated in food-borne poisoning. *Journal of Food and Drug Analysis* vol.24: 63 -7 1. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfda.2015.06.009>.
- Mahusain, N., Bayo, F., Karim, N., Zainol, M., Danish-Daniel, M. (2016). Determination of histamine levels in Longtail Tuna (*Thunnus tonggol*) stored at different temperature. DOI: <https://doi.org/10.7287/peerj.preprints.2360v1>.
- Manual de HACCP empresa.

- Marcobal A, de las Rivas B, Moreno-Arribas MV and Muñoz R. (2005). Multiplex PCR method for the simultaneous detection of histamine-, tyramine-, and putrescine-producing lactic acid bacteria in foods. *J. Food Prot.* 68, 4, 874-878.
- Maulvault, A. (2009). Valor nutricional de algumas espécies consumidas em Portugal. *Dissertação de Mestrado em Biologia Marinha*. Faculdade de Ciências do Mar e do Ambiente. Universidade do Algarve. DOI: <http://hdl.handle.net/10400.1/431>.
- Merline, X., Chitra, G. and Dhanalakshmi, B. (2015). Estimation of Amines and Amine Forming Bacterias in Edible Marine Fish *Sardinella longiceps* and its Product. *International Journal of Recent Scientific Research*, Vol. 6, Issue, 12, pp. 7936-7940.
- Morii, H., Kasama, K. (2004). Activity of Two Histidine Decarboxylases from *Photobacterium phosphoreum* at Different Temperatures, pHs, and NaCl Concentrations. *Journal of Food Protection*, Vol. 67, Nº 8: 1736-1742. DOI: <https://doi.org/10.4315/0362-028X-67.8.1736>.
- Nogueira, A. (2012). Inspeção e Tecnologia de Pescado. Relatório de Estágio Supervisionado. Universidade Federal do Paraná.
- Novella-Rodríguez, S., Veciana-Nogués, M., Vidal-Carou, M. (2000). Biogenic Amines and Polyamines in Milks and Cheeses by Ion-Pair High Performance Liquid Chromatography. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, vol. 48, nº11: 5117–5123. DOI: 10.1021/jf0002084.
- NP 1841 - Norma portuguesa. (1991). Pescado: determinação do teor de azoto de trimetilamina (N-TMA): método espectrométrico. Instituto Português da Qualidade.
- Nunes, M.L., Batista, I., Cardoso, C. (2007). Aplicação do índice de qualidade (QIM) na avaliação da frescura do pescado. *Publicações Avulsas IPIMAR*, 15, 51 p.
- Pan, B.S. and James, D. (Eds.) (1985). Histamine in marine products: production by bacteria, measurement and prediction of formation. *FAO Fish. Tech. Paper* (252). DOI: <http://www.fao.org/food/food-safety-quality/a-z-index/histamine/en/>.
- Pires, B., Fracalanza, S., Marin, V. (2013). O risco das amins biogénicas nos alimentos. *Ciência & Saúde Coletiva*, vol.19 nº4:1123-1134. DOI: 10.1590/1413-81232014194.18672012.
- Prester, L. (2011). Biogenic amines in fish, fish products and shellfish: a review, *Food Additives & Contaminants: Part A*, 28:11, 1547-1560, DOI: 10.1080/19440049.2011.600728.
- QIM Eurofish (2012). QIM Introduction. Disponível em www.qimeurofish.com.
- Regulamento nº 852 (2004) do Parlamento Europeu e do Conselho de 29 de Abril relativo à higiene dos géneros alimentícios (JO L 139 de 30.4.2004, p. 1).
- Rodriguez, M., Carneiro, C., Feijó, M., Júnior, C., Mano, S. (2014). Bioactive Amines: Aspects of Quality and Safety in Food. *Food and Nutrition Sciences* 5, 138-146. DOI:10.4236/fns.2014.52018.

- Sant'Ana, L., Soares, S., Vaz-Pires, P. (2011). Development of a quality index method (QIM) sensory scheme and study of shelf-life of ice-stored blackspot seabream (*Pagellus bogaraveo*). *Food Science and Technology* 44: 2253-2259.
- Silva, C., Da Ponte, D., Dapkevicius, M. (1998). Storage temperature effect on histamine formation in *Big Eye Tuna* and *Skipjack*. *Journal of Food Science*, Volume 63, No. 4. July 1998. DOI: 10.1111/j.1365-2621.1998.tb15803.x.
- Suanzes-Carpegna, D. (2003). Relatório sobre o atum: frota e indústria. Situação e perspectivas de futuro na UE e no mundo. Comissão de Pescas, Parlamento Europeu.
- Tahmouzi, S., Ghasemlou, M., Aliabadi, F., Shahraz, F., Hosseini, H., Khaksar, R. (2011). Histamine formation and Bacteriological quality in *Skipjack Tuna* (*Katsuwonus pelamis*): Effect of defrosting temperature. *Journal of Food Processing and Preservation*. DOI:10.1111/j.1745-4549.2011.00650.x.
- Teixeira, A. (2012). Avaliação da Qualidade e Segurança Alimentar de carapau (*Trachurus trachurus*) descarregado na lota de Peniche. Influência e características gerais da água de lavagem no pescado descarregado. *Dissertação de Mestrado*. Escola superior de turismo e tecnologia do mar. Instituto politécnico de Leiria.
- Vaz, A., Moreira, R., Hogg, T. (2000). Introdução ao HACCP. Associação para a Escola Superior de Biotecnologia da Universidade Católica (AESBUC).

Anexo I - Resultados de Histamina obtidos durante os meses de março e abril

Nº amostra	Identificação	Data	Absorvância		mg/L	Fator multiplicação	mg/kg
			Média	cv	<0.00mg/L	25	<LoQ
1	skipjack lombos	01/03/2017	0.016	0.0	<0.00mg/L	25	<LoQ
2	skipjack cru	01/03/2017	0.061	0.0	<0.00mg/L	25	<LoQ
3	skipjack lombos	01/03/2017	0.001	0.0	<0.00mg/L	25	<LoQ
4	skipjack cru	01/03/2017	0.035	0.0	<0.00mg/L	25	<LoQ
5	skipjack cru	07/03/2017	0.011	0.0	<0.00mg/L	25	<LoQ
6	skipjack cru	07/03/2017	0.009	0.0	<0.00mg/L	25	<LoQ
7	skipjack lombos	07/03/2017	0.016	0.0	<0.00mg/L	25	<LoQ
8	skipjack lombos	07/03/2017	0.046	0.0	-0.033mg/L	25	<LoQ
9	skipjack lombos	07/03/2017	0.020	0.0	-0.143	25	<LoQ
10	skipjack cru	07/03/2017	0.010	0.0	-0.099	25	<LoQ
11	skipjack lombos	09/03/2017	0.014	0.0	0.201mg/L	25	<LoQ
12	skipjack cru	09/03/2017	0.031	0.0	<0.00mg/L	25	<LoQ
13	skipjack lombos	09/03/2017	0.015	0.0	<0.00mg/L	25	<LoQ
14	skipjack lombos	13/03/2017	0.021	0.0	<0.00mg/L	25	<LoQ
15	skipjack cru	14/03/2017	0.061	0.0	<0.00mg/L	25	<LoQ
16	skipjack lombos	15/03/2017	0.015	0.0	<0.00mg/L	25	<LoQ
17	skipjack cru	20/03/2017	-0.001	0.0	<0.00mg/L	25	<LoQ
18	skipjack lombos	21/03/2017	0.011	0.0	<0.00mg/L	25	<LoQ
19	skipjack cru	21/03/2017	0.011	0.0	<0.00mg/L	25	<LoQ
20	skipjack lombos	24/03/2017	0.016	0.0	<0.00mg/L	25	LoQ
21	skipjack lombos	24/03/2017	0.017	0.0	<0.00mg/L	25	<LoQ
22	skipjack cru	24/03/2017	0.017	0.0	<0.00mg/L	25	<LoQ
23	skipjack lombos	27/03/2017	0.016	0.0	<0.00mg/L	25	<LoQ
24	skipjack cru	27/03/2017	0.013	0.0	<0.00mg/L	25	<LoQ
25	skipjack lombos	04/04/2017	0.022	0.0	<0.00mg/L	25	<LoQ
26	skipjack cru	04/04/2017	0.052	0.0	0.101mg/L	25	<LoQ
27	skipjack cru	11/04/2017	0.025	0.0	<0.00mg/L	25	<LoQ
28	skipjack cru	11/04/2017	0.112	0.0	0.781mg/L	25	19.52
29	skipjack cru	11/04/2017	0.017	0.0	<0.00mg/L	25	<LoQ
30	skipjack lombos	18/04/2017	0.025	0.0	<0.00mg/L	25	<LoQ
31	skipjack cru	20/04/2017	-0.009	0.0	<0.00mg/L	25	<LoQ
32	skipjack lombos	20/04/2017	0.007	0.0	<0.00mg/L	25	<LoQ
33	skipjack cru	20/04/2017	0.000	0.0	<0.00mg/L	25	<LoQ
34	skipjack lombos	26/04/2017	0.050	0.0	-0.217	25	<LoQ
35	skipjack cru	26/04/2017	-0.068	0.0	<0.00mg/L	25	<LoQ